

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

ADAM KEPES

1^{re} THÈSE. - Fixation des ions sur les protéines en solution

2^{me} THÈSE. - Propositions données par la Faculté

Soutenues le 8 Décembre 1955, devant la Commission d'examen

MM. WURMSER Président

FROMAGLOT

AUDUBERT

} examinateurs

[1955]

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

ADAM KEPES

1^{re} THÈSE. - Fixation des ions sur les protéines en solution

2^{me} THÈSE. - Propositions données par la Faculté

Soutenues le 8 Décembre 1955, devant la Commission d'examen

MM. WURMSER Président

FROMAGEOT }
AUDUBERT } examinateurs

NO. 100000
100

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE DEGRÉ DE DOCTEUR EN SCIENCES NATURELLES

PAR

ADAM KÉPER

1re THÈSE. Action des ions sur les cellules et l'osmose

2e THÈSE. Enzymes de la digestion et de l'assimilation



Reçu le 8 Décembre 1900 par la Bibliothèque de la Faculté des Sciences

M. WURMSEY, Libraire

BOMASOT

100000

AUDUBERT

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

DOYEN J. PERES

PROFESSEURS

ALIA	T Analyse supér. et Algèbre supér.	QUENEY	T Météor. et dyn. atmosphérique.
ARMOIS	T Enseignement de Physique.	GALLIEN	T Embryologie.
AVY	T Physiologie comparée.	EICHHORN	T Biologie végétale (P.C.B.).
B	T Mécanique physique et Expér.	DE CUGNAC	Biologie végétale (P.C.B.).
THENIER	T Electrotechnique générale.	M ^{re} CAUCHOIS	T Chimie physique.
ROGLIE	T Théories physiques.	THELLIER	T Physique du globe.
	T Chimie générale.	AUDUBERT	T Electrochimie.
ANT	T Anatomie et Histol. comparées.	L'HERITIER	T Génétique.
NIER	T Géométrie supérieure.	GRIVET	T Radioélectricité.
S	T Mécanique des fluides et appl.	PONCIN	T Mécanique des fluides.
IER	T Physiologie générale.	THIRY	T Mécanique appliquée.
URIE	T Physique (P.C.B.).	DUBREIL	T Arith. et théor. des nombres.
ABE	T Géol. struct. et Géol. appl.	QUELET	T Chimie organique.
ARMOIS	T Calc. des prob. et Phys. Math.	CAGNIARD	T Géophysique appliquée.
UCART	T Géogr. phys. et Géol. dynam.	CHAMPETIER	T Chimie macromoléculaire.
OLIOT-CURIE	T Physique nucléaire et radioactivité.	CUVILLIER	T Géol. struct. et Géol. appliquée.
TEFOL	T Botanique.	JUNG	T Pétrographie.
NNES	T Recherches physiques.	TRILLAT	T Chimie physique.
SE	T Evol. des êtres organisés.	WIEMANN	T Chimie (M.P.C.).
OST	T Chimie organique.	JACQUINOT	T Spectroscopie et Physique céleste.
LIGAND	T Applic. de l'analyse à la Géométrie.	VASSY	Physique de l'atmosphère.
UDRON	T Chimie appliquée.	DESTOUCHES	Théories physiques.
IRT	T Minéralogie.	M. PRUVOST	T Géologie.
SIER	T Zoologie.	AMIEL	T Chimie (P.C.B.).
GENOT	T Biologie végétale.	HOCART	T Minéralogie.
UGER	T Physique quantique et Relat.	J.-P. MATHIEU	T Physique (P.C.B.).
NIER	T Physiologie des fonctions.	COUTEAUX	T Biologie animale (P.C.B.).
TEAU	T Géologie.	MAY	Biologie animale (P.C.B.).
ARD	T Physique (E.N.S.).	CHOQUET	T Calcul diff. et intégral.
ARTAN	T Mathématiques (E.N.S.).	FELDMANN	Biologie (P.C.B.).
ITTE	T Chimie générale.	GUINIER	T Physique (P.C.B.).
ARD	T Mécanique générale.	JOST	T Biologie (P.C.B.).
LOMB	T Physique du globe.	FORTET	T Calcul des probabilités.
LOUSIN	T Biologie animale (P.C.B.).	SCHWARTZ	T Méth. math. de la physique.
ETIEN	T Chimie minérale.	CHOUARD	T Physiologie végétale.
RACH	T Zoologie.	MALAVARD	T Aviation.
TLER	T Physique.	BRELOT	T Calcul différentiel.
RUSSI	T Génétique.	NORMANT	T Chimie (P.C.B.).
MSER	T Biol. physico-chimique.	BENARD	Chimie (P.C.B.).
ERE	T Géologie (S.P.C.N.).	BUVAT	Botanique (E.N.S.).
THERET	T Biologie végétale (P.C.B.).	DUGUE	T Statistiques mathématiques.
AS	T Physique.	GELOSO	Chimie (S.P.C.N.).
THOMAS	T Biologie cellulaire.	SOULAIRAC	T Psychophysiologie.
ULF	T Optique appliquée.	ULRICH	T Physiologie végétale.
MORAND	T Physique.	MARECHAL	T Optique théorique et appliquée.
EILLET	T Physique.	KIRRMANN	T Théories chimiques.
TIER	T Mécan. expér. des fluides.	CHADEFAUD	Botanique.
ON	T Astronomie.	DESTRIAU	Physique (M.P.C.).
MAGEOT	T Chimie biologique.	M ^{re} LE BRETON	Physiologie générale.
ORTE	T Phys. génér. et radioact.	SALEM	Mathématiques générales.
ET	T Méc. anal. et méc. céleste.	ESCLANGON	T Physique (P.C.B.).
IT	T Biologie maritime.	LELONG	T Mathématiques générales.

Secrétaire Général Ch. MONIER

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552212_0057

I N T R O D U C T I O N

Les protéines ont la propriété remarquable de former des combinaisons dissociables avec une grande variété de petits ions ou de molécules neutres.

Ce phénomène de fixation a suscité un grand nombre de travaux au cours de ces deux dernières décades, dont les principaux sont ceux de l'école de Scatchard, de Klotz, de Teresi et ceux de Karush. Tous ces auteurs ont associé à ce phénomène la notion fondamentale d'emplacements (sites) particuliers sur la surface de la molécule de protéine.

Le nombre de ces emplacements est variable selon les protéines et les petites molécules en cause, mais il est souvent assez grand, de l'ordre d'une ou plusieurs dizaines. Or, la plupart du temps ces emplacements ne peuvent pas être identifiés purement et simplement à un groupe connu de fonctions polaires ou de chaînes latérales. Par exemple pour la fixation des anions les charges positives sur la surface de la protéine sont bien nécessaires, mais le nombre des emplacements n'est pas celui des fonctions cationiques et la partie non polaire de l'anion influe fortement sur son affinité envers la protéine. Il faut, pour expliquer ces faits, invoquer la juxtaposition de fonctions chargées et de surfaces paraffiniques, dans une configuration spatiale déterminée et l'intervention simultanée de forces d'interaction électrostatiques et de van der Waals. Dans certains cas, comme celui où l'affinité est sélé-

tive pour un isomère optique il faut admettre que l'interaction ion-protéine se fait au moins au niveau de trois éléments de surface par conséquent suppose des configurations complémentaires. (4, 15, 62)

Afin d'évaluer l'intérêt et la portée des études sur les fixations multiples il faut les situer dans la perspective de deux disciplines plus générales, l'étude de la structure fine des protéines et l'étude du mécanisme d'action des enzymes.

1) La structure fine d'une molécule de protéine résulte de sa structure primaire, c'est-à-dire la séquence des acides aminés constitutifs dans la chaîne polypeptidique d'une part, et de sa structure secondaire définie par le plissement de cette chaîne selon une configuration unique, d'autre part. Il ressort des études sur la dénaturation des protéines que cette structure secondaire est maintenue dans la protéine native par une multitude de liaisons de faible énergie, dont les principales sont les ponts H entre azote et carbonyle de liaisons peptidiques juxtaposées. Selon la théorie de Pauling cette structure secondaire consiste en un enroulement hélicoïdal des chaînes polypeptidiques, et plusieurs hélices sont juxtaposées parallèlement pour former la molécule. Dans une telle configuration, des restes d'acides aminés, même très éloignés les uns des autres dans la chaîne polypeptidique, peuvent se trouver côte à côte sur la surface de la molécule de protéine. Ainsi la connaissance, même complète de la séquence d'acides aminés constituant la molécule de protéine pourra ne pas apporter une explication suffisante des propriétés spécifiques de celle-ci.

En effet la plupart de ces propriétés spécifiques sont liées à l'intégrité de la configuration native. La spécifi-

cité immunologique, la spécificité et l'activité enzymatique, etc.. sont en général détruites par la dénaturation, qui consiste en la désorganisation de la structure secondaire, sans affecter les liaisons peptidiques.

Or, si l'étude de la structure primaire est entrée dans une phase positive grâce au développement de méthodes efficaces d'analyse séquentielle, par contre l'étude de la configuration fine de la molécule de protéine native progresse encore lentement à l'aide de méthodes nombreuses mais souvent indirectes.

Des méthodes physiques basées sur la viscosité, la diffusion de la lumière, la sédimentation, la diffusion et l'électrophorèse ont permis dans des cas favorables de préciser non seulement la grosseur mais encore la forme; globulaire ou allongée, et le degré d'^{ta}hydratation des molécules de protéine. Les études par les rayons X ont permis de détecter certaines équidistances, certaines périodicités dans la structure qui sont à la base même de la théorie des hélices. Mais la connaissance de la configuration globale, de la silhouette de la molécule ne permet pas la compréhension des propriétés caractéristiques des protéines, leur immense variété et leur rôle biologique. Il faudrait pour cela connaître la configuration détaillée de sa surface. L'étude des propriétés électrolytiques des protéines à l'aide de l'électrophorèse et des titrages potentiométriques a peu contribué au problème de la structure fine. Il semble en effet que ces propriétés peuvent être déduites de celles d'un mélange d'ions monovalents en appliquant certaines corrections dues à la simple interaction électrostatique, entre charges réparties uniformément ou statistiquement sur la surface de la molécule.

tion multiple la réaction du seul centre actif qui aboutit à la réaction enzymatique. En résumé il n'existe pas de frontière tranchée quant au degré de spécificité entre les réactions dites spécifiques et les fixations multiples.

Etant donné l'analogie des forces d'interaction mises en jeu au cours des fixations spécifiques et non spécifiques on conçoit l'intérêt suscité par l'étude de ces dernières, qui offrent un modèle accessible par des méthodes indépendantes.

Un cas précis de l'utilité de ces études est la découverte d'un modèle pour un activateur couplé. Klitz a constaté que des ions métalliques peuvent servir d'intermédiaire dans la fixation de molécules neutres sur une protéine. La fixation des molécules neutres est faible en l'absence du métal, elle se renforce quand on ajoute le métal qui a une affinité simultanément envers la protéine et envers la molécule neutre. Ce système est le premier modèle connu à l'appui de l'hypothèse selon laquelle certains ions activateurs d'un enzyme ont pour rôle essentiel de permettre la formation d'un complexe enzyme-métal-substrat. (91)

On pourrait poursuivre l'analogie entre les réactions spécifiques et non spécifiques, jusqu'à certaines conséquences biologiques qu'elles entraînent. On connaît de nombreux exemples où la présence du substrat ou d'un cofacteur augmente la résistance à la dénaturation d'un enzyme, de même la fixation multiple d'anions ou de cations (13, 14, 38) exerce un effet protecteur sur la sérum-albumine. On peut interpréter cet effet comme le résultat d'une fixation par plusieurs points, rendant la structure de la protéine plus rigide.

La fixation par plusieurs points est le fait le plus saillant des réactions propres aux protéines; c'est elle qui est

- 1 -

capable d'expliquer l'immense variété des aptitudes réactionnelles des protéines en mêmes temps que la relative spécificité de chacune de leurs réactions.

Tandis qu'une telle nature complexe des emplacements n'a pas été mise en doute, un grand nombre de travaux ont tenté d'interpréter les fixations multiples en admettant l'hypothèse d'emplacements uniformes, ayant tous la même affinité intrinsèque pour un ion. Cependant dans des travaux récents comme ceux de Karush (58, 63) Scatchard (116, 117), Carsten et Eisen (23) etc., il apparait de nombreux exemples où l'hypothèse des emplacements homogènes n'est pas vérifiée. De plus dans les cas où cette hypothèse suffisait à rendre compte des données de l'expérience elle n'a pas été soumise à des critères plus rigoureux. En particulier la variation des affinités en fonction du pH qui était susceptible de fournir des renseignements plus nuancés sur la structure des emplacements a été très peu étudiée.

Notre travail a été entrepris dans le but de mettre en évidence la complexité du phénomène de fixation multiple, conformément à la complexité de la structure fine des protéines et nous avons cherché à approfondir en particulier les variations de ces fixations en fonction du pH.

La première partie de cette thèse est une revue critique de l'état actuel de la question des fixations multiples. Une brève énumération des différentes méthodes employées est suivie du résumé des diverses théories par ordre de complexité croissante. Cela nous amène à définir les critères de l'homogénéité des emplacements et à examiner leur application dans les travaux publiés. Enfin, nous résumons diverses interprétations reliant les phénomènes observés à la structure des protéines.

La description de nos méthodes expérimentales forme la deuxième partie.

Suivent les résultats de nos expériences obtenus par la méthode potentiométrique dans la troisième partie par la méthode polarographique dans la quatrième partie, concernant la fixation des ions alcalinoterreux, du cadmium, du Bleu de Méthylène et du Sulfocyanure sur la sérumalbumine et la Lactoglobuline.

Enfin dans la 5ème partie les variations des fixations en fonction du pH constatées dans nos expériences sont confrontées avec des résultats analogues trouvés dans la littérature et interprétés aux termes d'une théorie tenant compte de plusieurs mécanismes simultanés.

■ ■ ■ ■ ■

P R E M I E R E P A R T I E

REVUE CRITIQUE DE L'ETAT ACTUEL DE NOS CONNAISSANCES SUR LES COMPLEXES MULTIPLES.

I. - METHODES D'ETUDE.- De nombreuses méthodes ont été employées pour ces études. Certaines de ces méthodes permettent de déterminer directement le nombre de molécules fixées par molécule de protéine, par différence entre la concentration totale du corps à complexer et sa concentration en équilibre avec le complexe protéinique. D'autres méthodes permettent seulement de déterminer le degré de saturation des emplacements disponibles, par mesure des modifications de certaines propriétés physiques ou biologiques que provoque la formation des complexes. Nous les appellerons méthodes indirectes.

Nous nous contenterons d'une brève énumération de ces méthodes.

A/ METHODES DIRECTES.

1) Méthodes directes par équilibre entre deux phases.- L'une des phases contient la protéine, l'autre n'en contient pas. Le constituant commun des deux phases est la molécule ou l'ion à complexer dont la forme libre doit obéir à un équilibre non influencé par la présence de la protéine. Ce constituant

est dosé dans la phase dépourvue de protéine par des méthodes volumétriques, colorimétriques ou pondérales. Parmi ces méthodes les plus employées sont:

- La dialyse d'équilibre (107, 71). Méthode simple et très répandue. (23, 26, 29, 30, 45, 58, 60, 62, 64, 69, 71, 79, 85, 88, 90, 101, 120, 132).

- Le partage entre deux solvants non miscibles (61).

- Les mesures de solubilité (41). Applicables seulement aux corps peu solubles. L'excès de solubilité en présence de protéine est du à la formation d'un complexe soluble. Seul l'équilibre correspondant à la saturation de la solution peut être déterminé.

- Ultracentrifugation (25, 99)

- Ultrafiltration

2) Méthodes directes en phase homogène.

- Polarographie. Applicable à un grand nombre de corps réductibles à l'électrode à goutte de mercure (67, 102, 110, 124, 126 - 128).

- Conductimétrie. Applicable aux corps ionisés mais sans spécificité.

- Potentiométrie avec une électrode métallique réversible (116, 117) (surtout Ag-AgCl).

- Potentiométrie avec une électrode à membrane perméable soit aux cations seuls, soit aux anions seuls (18, 22, 108).

- Potentiométrie avec une électrode à hydrogène (Pt platiné ou électrode de verre) (39, 66, 114, 115) .

B/ METHODES INDIRECTES.

La fixation aboutit à un changement mesurable dans une des propriétés physiques ou biologiques de la protéine, mais le calcul du nombre d'ions fixés dépend d'hypothèses simplificatrices.

- Electrophorèse applicable quand la fixation modifie la charge nette de la protéine (2,3,7,98, 113, 123, 136,137).

- Méthodes optiques diverses basées sur les changements de: diffusion (49,104, 105, 57), absorption (44,55,70,82,83, 135), pouvoir rotatoire, polarisation de fluorescence (95,43).

- Méthodes biologiques (activité enzymatique, résistance à la dénaturation (8,11,13,14,28,37,38,46-51,54,65,100,122).

II.- BASES THEORIQUES

A) FIXATION SIMPLE.- Les fixations doivent être interprétées par la loi d'action de masse. Pour une réaction où la protéine possède un seul emplacement :



$$\frac{(P) (A)}{(PA)} = K$$

Si on définit le degré de formation du composé par

$$\frac{(PA)}{(PA) + (P)} = r$$

on obtient

$$r = \frac{(A) K}{1 + (A) K}$$

①

qui est une équation d'hyperbole. (Langmuir)

La représentation de r en fonction de (A) donne une courbe de saturation hyperbolique bien connue.

La demi-saturation a lieu pour une concentration $(A)=1/K$

Si on représente au contraire r en fonction de $\log A$ on obtient une courbe en S symétrique autour de son point d'inflexion dont les coordonnées sont $r = 1/2$; $\log(A) = -\log K$

$$\text{Log}(A) = \text{Log} K - \log[r/(1-r)] \quad (2)$$

cette courbe s'appelle la courbe de formation du complexe (Bjerrum 9)

Enfin il existe deux possibilités de représentations linéaires $1/r$ en fonction de $1/(A)$:

$$\frac{1}{r} = \frac{1}{K} \frac{1}{(A)} + 1 \quad (3)$$

qui équivaut à la représentation de Lineweaver et Burke, employée en cinétique où $r = \frac{V}{V_{\max}}$

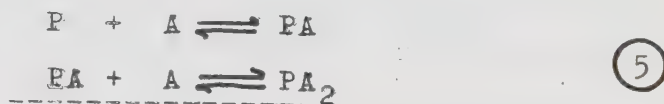
Et $r/(A)$ en fonction de r :

$$\frac{r}{(A)} = K + r \quad (4)$$

L'intérêt de ces représentations réside dans la possibilité de vérifier plus complètement l'équation (1) et de tenir compte de tous les points expérimentaux pour le calcul de la constante K .

B/ FIXATIONS MULTIPLES.

Dans le cas des fixations multiples il est impossible de connaître chaque terme des réactions successives entre une molécule de protéine P et des molécules ou ions A



Ce que l'on peut connaître par une méthode directe est le nombre moyen $\bar{r}$ de molécules A fixées par molécule de protéine.

$$\bar{r} = \frac{\sum_{i=1}^n i (PA_i)}{\sum_{i=0}^n (PA_i)} = \frac{\sum_{i=1}^n (A)^i \prod_{l=1}^i K_l}{\sum_{i=0}^n (A)^i \prod_{l=0}^i K_l}$$

Cette dernière expression vient de l'application successive de la loi d'action de masse aux réactions (5). Les constantes K_i caractérisent la fixation du i -ième ion sur un complexe en contenant déjà $i - 1$



Mais les formules PA_{i-1} et PA_i correspondent à un grand nombre d'espèces différentes et les K_i représentent une moyenne des différentes réactions qui aboutissent à la fixation du i - ième ion.

Une autre expression

$$\bar{r} = \sum_{j=1}^n r_j = \sum_{j=1}^n \frac{(A) K_j}{1 + (A) K_j}$$

met en évidence la fixation de l'ion sur le j -ième emplacement indépendamment de l'état où se trouvent les autres emplacements r_j est le degré de saturation de l'emplacement j , K_j prend une signification plus concrète mais il peut varier selon l'état où se trouvent les autres emplacements.

Quelle que soit l'expression adoptée la connaissance de n paramètres K est nécessaire à la description complète du phénomène.

1) Fixation homogène sans interaction des emplacements.

Le traitement se simplifie beaucoup si toutes les constantes d'interaction K_j sont égales et invariables. Les K_i auront pour expression :

$$K_i = K \frac{n-i+1}{i}$$

où $(n-i+1)/i$ est le facteur statistique qui exprime que la formation du i -ième complexe se fait avec une probabilité proportionnelle au nombre d'emplacements disponibles $n-i+1$ sur le complexe PA_{i-1} , alors que sa dissociation aura une probabilité proportionnelle au nombre d'emplacements occupés i (9,72,106,121).

L'équation (1) s'écrit

$$r = \frac{nK(A)}{1 + K(A)}$$

(1')

La forme de la courbe $r = f(A)$ reste hyperbolique, celle de $r = f(\log(A))$ reste un S symétrique avec un point de demi-saturation $r = n/2$ pour $(A) = 1/K$. Enfin les deux représentations linéaires restent possibles :

$$\frac{1}{r} = \frac{1}{nK} \frac{1}{(A)} + \frac{1}{n}$$

(3')

et

$$\frac{r}{(A)} = Kn - Kr$$

(4')

2) Fixation homogène avec interaction électrostatique entre les emplacements.

Dans le cas où la molécule fixée sur la protéine est ionisée la fixation modifie la charge nette de la protéine. Le travail électrostatique nécessaire à la fixation d'ions successifs augmente et l'affinité apparente des complexes successifs pour les ions diminuera plus que proportionnellement au nombre d'emplacements restés disponibles.

$1/(A)$ en fonction de $1/r$ où $r/(A)$ en fonction de r vont dévier de la linéarité.

Le travail électrostatique moyen, effectué quand la protéine porte $r z'$ charges supplémentaires

$$+\Delta F_{\text{électr.}} = \frac{r(z')^2 \epsilon^2}{D} \left(\frac{1}{b} - \frac{\kappa}{1+\kappa a} \right)$$

par ion fixé ou Z' est la charge de l'ion la charge élémentaire D la constante diélectrique, a la rayon de la molécule, b le rayon d'approche, $1/\kappa$ l'épaisseur de l'athmosphère ionique selon DERBYE et HÜCKEL (1,35)

ou bien :

$$+ \Delta F_{\text{electr.}} = \frac{r N (Z')^2 \epsilon^2}{D} \left(\frac{1}{b} - \frac{\kappa}{1+\kappa a} \right)$$

pour une molécule gramme.

$$\text{En appelant } w = \frac{\Delta F_{\text{electr.}}}{2r R T} = \frac{N(Z')^2 \epsilon^2}{2 R T D} \left(\frac{1}{b} - \frac{\kappa}{1+\kappa a} \right)$$

et en considérant que

$$\Delta F = \Delta F^0 + \Delta F_{\text{electr.}} = -RT \ln K_{\text{app}} = -RT \ln K^0 + RT 2wr$$

$$\text{on obtient } K_{\text{app}} = K^0 e^{-2wr}$$

Et il faudra tester la validité de l'équation

$$\frac{r}{(A)} e^{2wr} = K_n + K_r \quad (6)$$

qui devra être linéaire en représentant le premier terme en fonction de r . (116,117).

Souvent la valeur théorique de w ne convient pas et de nombreux auteurs définissent des "valeurs expérimentales" de w traité comme un paramètre. Ou bien encore on affecte Z' d'un coefficient inférieur à l'unité pour tenir compte de la fixation simultanée de l'ion de signe opposée (53).

3) Fixation homogène avec interactions compétitives ou coopératives.

Quand plusieurs molécules se fixent sur une molécule de protéine on peut concevoir d'autres formes d'interaction que l'interaction électrostatique. Ces interactions peuvent être compétitives (par empêchement stérique par exemple) ou coopératives dans le cas où les fixations successives stabilisent le complexe. Il est difficile de tenir compte de ces interactions sans connaître leur nature exacte, mais dans certains cas une formule approchée peut donner une bonne concordance.

$$\frac{r}{(A)} = \frac{K (A)^a}{1 + K (A)^a} \quad (7)$$

où $0 < a < 1$ dans le cas d'une interaction compétitive
et $a > 1$ dans le cas d'une interaction coopérative (Corye 1,34)

4) Fixations hétérogènes.

Il arrive souvent que les données expérimentales ne satisfassent aucune des équations ci-dessus. Il faut alors admettre une fixation inhomogène, c'est-à-dire l'existence d'emplacements de configuration ou de nature différentes ayant des constantes d'interaction indépendantes. Chacun des emplacements, ou groupe d'emplacements homogène, obéit aux équations (1) (2) (3) et (4), mais on ne peut expliciter la somme de ces équations (61) que pour le cas limite où r tend vers zéro en même temps que (A) :

$$\left(\frac{r}{(A)} \right)_{r \rightarrow 0} = \sum_{j=1}^n K_j \quad (8)$$

Pour effectuer l'extrapolation vers zéro de l'équation

(4') avec une précision satisfaisante, il faut que l'expérience couvre des valeurs suffisamment basses de (A) et de r .

Dans quelques cas particuliers de fixation inhomogène il a été possible d'analyser de façon plus approfondie les phénomènes en admettant des hypothèses simplificatrices. C'est ainsi que Karush et Sonenberg (58) ont pu interpréter la fixation des alkylsulfates sur la sérumalbumine en admettant des constantes d'interaction distribuées autour d'une valeur moyenne selon la loi de Gauss. Dans un autre cas Karush a pu rendre compte des résultats expérimentaux (concernant la fixation du p2 hydroxy-5-méthyl-phénylazobenzoate sur la sérumalbumine (59), en supposant deux groupes homogènes d'emplacements avec deux constantes d'interaction différentes. L'ajustement des paramètres ne peut être fait que par des approximations successives laborieuses. L'auteur souligne lui-même l'arbitraire du choix de ces paramètres qui aboutit à des nombres fractionnaires d'emplacements dans chacun des deux groupes.

Carsten et Eisen (23) qui ont tenté la même méthode pour l'interprétation de la fixation des dérivés du dinitrobenzène ont abouti à des résultats qui rendent plus évident encore l'arbitraire des hypothèses. Les groupes d'emplacements à forte et à faible affinité semblent être en proportion variable selon la température, et le nombre classé dans le premier groupe peut descendre au-dessous de un.

5) Fixations coopératives.

Dans certains cas les données expérimentales donnent des courbes sigmoïdes dans la représentation (1) ou (4). (63, 29-33). Dans ce cas on doit admettre que la fixation des premiers ions rend disponibles de nouveaux emplacements, masqués sur la molécule initiale. Dans ces cas, l'extrapolation selon (6) donne la somme des constantes d'interaction des seuls emplacements disponibles sur la molécule primitive et non celles des emplacements rendus accessibles par la suite. Pour faire la théorie complète des réactions, il faut alors un grand nombre de paramètres. Les approximations successives deviennent trop laborieuses, les résultats trop arbitraires pour qu'un pareil travail ait jamais été tenté.

6) Exemples tirés de la littérature.

Le Tableau I. donne la liste des fixations multiples où l'application de la loi d'action de masse a été suffisamment poussée.

Les résultats obtenus par divers expérimentateurs sur les mêmes objets sont rapprochés pour permettre la comparaison.

L'examen de ce Tableau montre combien rares sont les cas où la fixation est indiscutablement homogène; dans les cas de fixation inhomogène il est rarement possible d'appliquer avec succès des hypothèses simplificatrices (2 groupes homogènes d'emplacements). Dans la majorité des cas il faut se contenter de connaître $\sum K_j$ par extrapolation, et dans le cas des courbes sigmoïdes, même cette expression perd beaucoup de sa signification.

T A B L E A U 1

PROTEINE	MOLECULE, ou ION FIXE	METHODE	DOMAINE EXPLORE en r	NATURE, VERIFIEE par EQUATION N°	n EXTRAPOLE	OBSERVATIONS	REF.
Caséine	Ca ⁺⁺	Ultracentrifugation	0 à 9	Homogène (3)	16	pK invariable de pH 6,3 à 7,3	(25) (72)
Caséine	Ca ⁺⁺	Electrode à membrane		Homogène (1)		pK variable avec pH	(22)
Sérumalbumine boeuf	Méthylorange	Dialyse	0 à 15	Homogène (3)	22,4		(71)
d°	d°	Partage	0 à 1		3 - 4	(Extrapolation personnelle)	(61)
d°	Azotsulfathiazol	Dialyse	0 à 9	Homogène	?	Interaction électrostatique w env. 1/3 de la théorie	(71)
d°	Alkysulfates	Dialyse	0 à 10	Inhomogène	14	Dispersion statistique du K	(58)
d°	Colorant diazoïque Voir texte p. 18	Dialyse	0 à 17	Inhomogène 2 groupes	22 n ₁ = 4,8		(59)
d°	d° Isomère D	Dialyse	0 à 17	Sigmatide			(62)
d°	Ca ⁺⁺	Electrode à membrane	0 à 8	Homogène (1)	8	Homogénéité admise sans preuve graph.	(20)
d°	Cu	Spectre Dialyse	1 à 10	Homogène		Considérée inhomogène par Scatchard (119)	(76)
Sérumalbumine humaine	Zn	Dialyse	0 à 8	Homogène	14 à 16	Domaine de pH 6 à 8,5. Emplacement imidazol diss.	(53)
d°	Cl SCN	P. osmotique pH potentiométrie Ag - AgX	0 à 10 0 à 30	Inhomogène 2 groupes	36		(115) (116) (117)

T A B L E A U 1 (Suite)

PROTEINE	MOLECULE ou ION FIXE	METHODE	DOMAINE EXPLORÉ en r	NATURE, VERIFIEE par EQUATION N°	n EXTRAPOLE	OBSERVATIONS	REFERENCE
Sérumalbumine	Phénylbutyrate Cinnamate Hippurate Phénylacétate Phénoxyacétate O. nitrophénol P. nitrophénol m. nitrophénol 2-4 di nitrophénol	Dialyse do do do do do do do do	2 à 6 2,5 à 5,5 0,25 à 3 2 à 5 2 à 4,5 0,7 à 5 2,5 à 8 1,6 à 4,5 2,5 à 5	Homogène 3 do do do do do do do	24 25 9 25 7 6 22-24 25 6		(132)
Sérumalbumine	2-4 di nitrophénol DNP amino caproate Dinitrobromo benzène Amino-di nitro benzène Dinitro toluène	Dialyse do do do do do do	0 à 9 0 à 9 0 à 9 0 à 2,5 0 à 2,5	Inhomogène do do do do do		Cf (132) ci-dessus	(23)
Lysozyme	Méthylorange	Dialyse	Pas de complexe				(74)
Lysozyme	Méthylorange	Précipitation	0 - 10	Sigmoide			(29)

C/ DEPENDANCE DU pH.-

Les variations d'activité de l'ion hydrogène peuvent influencer sur les fixations multiples de trois manières.

1) Effet de l'ion hydrogène par action de masse.

L'état d'ionisation de l'emplacement est déterminant pour la possibilité de la fixation. Ce cas a été traité magistralement par Dixon (36) appliqué aux constantes d'interaction enzyme-substrat et enzyme-inhibiteur.

En considérant un seul emplacement deux cas sont possibles:

a) P, PH^+ , et PA existent, PH A est impossible, il y a compétition entre H^+ et A.

quand $\text{pH} \gg \text{pK}_h$, (PH^+) est négligeable, l'affinité apparente de A est constante, indépendante du pH $K_A = \frac{(\text{PA})}{(\text{P})(\text{A})}$

quand $\text{pH} \ll \text{pK}_h$, (P) est négligeable

$$K_A = \frac{(\text{PA})(\text{H}^+)}{(\text{PH}^+)(\text{A})}; K_{\text{app}} = \frac{(\text{PA})}{(\text{PH}^+)(\text{A})} = \frac{K_A}{(\text{H}^+)} \quad \text{varie}$$

linéairement avec (H^+) ; $\log K_{\text{app}}$ en fonction de pH est une droite ascendante de pente + 1.

b) P, PH^+ et PH^+A sont les seuls composés existant, PA est impossible. Il y a coopération entre H^+ et A.

quand $\text{pH} \ll \text{pK}_h$ (P) est négligeable

$$K_A = \frac{(\text{PH}^+\text{A})}{(\text{PH})(\text{A})} \quad \text{est indépendant du pH}$$

quand $\text{pH} \gg \text{pK}_h$, (PH^+) est négligeable.

$$K_A = \frac{(\text{PH}^+\text{A})}{(\text{P})(\text{H}^+)(\text{A})} \quad \text{et} \quad K_{\text{app}} = \frac{\text{PH}^+\text{A}}{(\text{P})(\text{A})} = K_A(\text{H}^+) \quad \text{dépend}$$

linéairement de (H^+)

$\log K_{\text{app}}$ en fonction de pH est une droite descendante de pente - 1. On voit donc que la représentation proposée par

Dixon $\log K = f(\text{pH})$ est caractérisée par des segments rectilignes de pentes 0, +1, -1, etc... raccordés par des segments curvilignes (pour les équations voir Dixon et 5-ème partie). L'intersection extrapolée des segments rectilignes définit le pK de l'ion H^+ déterminant. Ces courbes s'apparentent aux courbes bien connues de $E'_h = f(\text{pH})$ des indicateurs d'oxydo-réduction. Les équations correspondantes sont de même forme. Cet effet d'action de masse est particulier à chaque emplacement, et peut varier de l'un à l'autre.

2) Interaction électrostatique.

La théorie de Dixon ne tient pas compte dans le cas de la fixation d'un ion, du fait que la charge nette de la protéine varie avec le pH et entraîne une variation du travail électrostatique de la fixation. Ce travail électrostatique a la même formulation que dans le cas traité plus haut, de la fixation avec interaction électrostatique entre ions fixés. Il a été appliqué par Scatchard et coll. (116, 119).

$$K_{\text{app}} = K e^{-2\bar{h}Z}$$

ou $\bar{h}$ est le nombre d'ions H^+ associés à une molécule de protéine. $h = 0$ au point isoionique, il peut prendre des valeurs positives ou négatives.

Ici $\log K_{\text{app}}$ est une fonction linéaire de $\bar{h}$, sa pente est de $-2WZ/2,303$ c'est-à-dire descendante pour un cation, ascendante pour un anion, et nulle pour une molécule neutre. L'effet électrostatique est commun à tous les ions fixés indépendamment de la nature de l'emplacement. Il faut remarquer que la dépendance de pH n'est pas directe, et le tracé de $\log K = f(\text{pH})$ n'est rectiligne que dans les zones où la courbe de titrage de la protéine présente elle-même un segment

rectiligne. Dans le cas général pour vérifier la présence simultanée des effets d'action de masse et électrostatique il faut tracer la courbe $\frac{K_{app}}{e^{2whz}} = f(pH)$ pour obtenir des courbes prédites par la théorie de Dixon. On peut éventuellement ajuster le paramètre w pour obtenir des segments horizontaux postulés par Dixon. Le résultat peut permettre d'identifier un ou plusieurs pK qui caractérisent des fonctions ionisables présentes dans les emplacements.

3) Modification de structure.

Enfin on peut concevoir que la fixation d'un ion H^+ modifie la fixation d'ions ou de molécules neutres en modifiant la configuration de l'emplacement, ou encore la configuration globale de la molécule de protéine. Contrairement au cas de l'action décrit en 1), l'emplacement peut rester accessible sous les deux formes P ou PH mais avec des affinités différentes

$$\frac{(PA)}{(P)(A)} \neq \frac{(PH^+A)}{(PH)(A)}$$

Un tel changement de configuration a été postulé par divers auteurs (89,61), mais sa nature reste encore sujette à spéculations. L'hypothèse d'un allongement, voire d'un déplissement de la molécule de protéine sous l'effet répulsif de ses centres anioniques a pu être soulevée (61). La possibilité d'un changement plus localisé par formation ou rupture d'un pont H a reçu une interprétation mathématique partant de bases purement théoriques (94). Son application à l'expérience n'a pas encore été tentée.

4) Exemples tirés de la littérature.

Les études systématiques sur la variation des constantes d'association avec le pH sont rares. Citons les études de Dixon

et Massey sur les associations enzyme-substrat et enzyme-inhibiteur (37) qui ont démontré la fécondité des théories de Dixon, tout en négligeant la possibilité d'interactions électrostatiques. On peut se demander si dans le cas de fixations multiples on peut obtenir des résultats aussi nets, surtout si les emplacements sont inhomogènes. Citons encore les études de Gurd et Godman (53) concernant la fixation du Zn sur la sérumaIbumine qui démontre l'intervention des fonctions imidazol de l'histidine. Citons encore le travail de Karush (61) concernant la fixation du méthylorange sur la sérumaIbumine. L'auteur se borne à constater que l'effet électrostatique seul est insuffisant pour expliquer les variations de l'affinité avec le pH. Il suppose un changement structural à pH élevé. Nous en tenterons une interprétation dans la 5ème partie de cette thèse.

III/ QUELQUES RESULTATS ET LEUR INTERPRETATION CONCERNANT LA STRUCTURE DES PROTEINES.

La fixation des anions a été particulièrement étudiée. Par l'utilisation de protéines modifiées Klotz et coll. ont prouvé que les fonctions cationiques, en particulier les restes lysine sont essentiels pour ces fixations. Cependant tous les centres cationiques ne servent pas d'emplacements, le nombre de ceux-ci pour une protéine donnée peut varier considérablement selon la nature de l'anion fixé.

Dans une série homologue d'anions organiques l'affinité augmente avec la longueur des chaînes paraffiniques. Ceci prouve l'intervention de forces de Van der Waals parmi les forces d'interaction. Pour l'efficacité de ces forces il faut que la partie non polaire de l'ion présente une surface complémentaire à une région de la surface de la protéine au voisinage immédiat

du centre de fixation électrostatique. Dans le cas de chaînes aliphatiques flexibles, celles-ci épousent facilement la surface de la protéine, d'où une forte interaction (III, 134). Dans le cas de composés aromatiques, de structure plus rigide, de petits détails de la configuration peuvent avoir une influence décisive sur la possibilité d'interaction. C'est ainsi que la sérumalbumine présente 24 emplacements pour le m ou p nitrophénol mais seulement 6 pour l'isomère o (132, Tabl.I). La même protéine présente une notable différence d'affinité pour les deux isomères optiques d'un ion colorant phényl p (p-diméthyl-animobenzène azo)-benzoylaminoacetate) (62), ce qui implique un contact par trois points de la surface. Cette différence d'affinité concerne surtout les 4 premiers emplacements occupés, pour les autres emplacements les affinités s'égalisent, l'interaction devient plus lâche. Cet exemple montre bien qu'une forte spécificité va de pair avec une affinité élevée, et suppose une meilleure coaptation des surfaces.

Cependant les chaînes latérales de la protéine peuvent également prendre de nombreuses configurations et réaliser des emplacements favorables à la fixation de molécules variées. Cette aptitude est très variable d'une protéine à l'autre. Les sérumalbumines occupent une place privilégiée du point de vue de l'adaptabilité de leur configuration (62,63). Dans le cas de la fixation l'anions variés, Klotz (79) attribue cette adaptabilité de la sérumalbumine à la liberté des restes lysyl qui participent peu aux ponts hydrogène avec les fonctions oxhydryl. Ces derniers, en nombre relativement petit dans la sérumalbumine, formeraient des ponts hydrogène de préférence avec les groupements carboxyliques.

Dans beaucoup de cas, le modèle des emplacements homogènes

permet le calcul approché des changements thermodynamiques au cours de la réaction. En général le coefficient de température de la réaction est faible et le changement d'entropie est fortement positif, ce qui dénote une augmentation du nombre de degrés de liberté. Ceci a pu être attribué à la libération de plusieurs molécules d'eau d'hydratation "gelée" ou bien à la rupture d'un ou plusieurs ponts d'hydrogène augmentant le degré de désordre (79).

Cependant il convient de se méfier des représentations simplifiées qui souvent ne résistent pas à une expérimentation plus précise ou plus étendue (58). De nombreuses discordances ont pu être relevées dans la littérature, concernant l'homogénéité des emplacements. En fait il faudrait, pour pouvoir affirmer une telle homogénéité disposer de plusieurs critères. Le premier est la vérification des équation (3') et (4') dans un large domaine de concentrations, le second l'invariabilité du nombre d'emplacements avec le pH, le troisième serait la compétition homogène de deux composés ayant les mêmes emplacements. Ce dernier critère, sans doute le plus sensible n'a été employé que par Karush (59,62), et la compétition a été trouvée différente dans la zone des basses concentrations et dans la zone des concentrations élevées.

En fait nous ne trouvons dans la littérature aucun cas, où deux seulement de ces critères d'homogénéité soient réunis, alors que dans de nombreux cas l'hétérogénéité ne fait aucun doute. Etant donné la complexité de la structure des protéines il ne semble pas qu'on puisse s'attendre à une telle homogénéité si le nombre des emplacements n'est pas très petit.

Il reste à discuter les déductions qu'on peut tirer de cette variété de fixations multiples qui donnent une courbe

sigmoïde dans les représentations (1') (3') et (4'). Dans ces cas une barrière semble s'opposer aux fixations, barrière qui une fois franchie par un petit nombre d'ions, rend disponible des emplacements supplémentaires. Karush (62) y voit le signe d'une pénétration des ions, dans les espaces interhélicaux de la protéine, provoquant un écartement des hélices, ouvrant ainsi la voie à la pénétration d'autres ions. Laskowski et Sheraga (94) donnent une explication plus générale. Ils admettent que la fixation se fait sur des groupements susceptibles de participer à des liaisons hydrogène. La compétition entre les deux sortes de liaisons peut donner une explication du phénomène que ces auteurs ont mis en équation. Colvin (30) suppose un troisième mécanisme, qui consiste à admettre une couche d'eau fortement polarisée autour des centres chargés. Un ion qui pénètre sous cette couche et neutralise une charge provoque la désorganisation de la couche polarisée et facilite la fixation d'ions supplémentaires.

A l'heure actuelle il n'y a aucune possibilité de choisir entre ces trois interprétations possibles, car elles ne peuvent être traitées que de façon semi-quantitative. Cependant les deux premières hypothèses, à savoir la pénétration dans les espaces interhélicaux et la compétition avec les ponts H, loin de s'exclure, se complètent et il est possible que les trois phénomènes puissent jouer ensemble ou séparément. Signalons que l'hypothèse de Karush rejoint une théorie plus récente de Tanford (131), selon laquelle les ions peuvent pénétrer à l'intérieur de la surface hydrodynamique des protéines fortement hydrophiles. Cette théorie a été rendue nécessaire par les discordances des valeurs expérimentales de l'énergie libre électrostatique des protéines par rapport aux valeurs calculées

par la théorie de Debye Huckel avec un modèle de molécule en sphère compacte. La théorie de Tanford a permis d'interpréter de façon très satisfaisante les courbes de titrage électrométrique des protéines. Elle est basée sur des hypothèses très plausibles et il est certain qu'elle pourra rendre des services dans l'interprétation d'autres phénomènes. Elle pourra peut-être réduire l'incohérence actuelle des énergies électrostatiques expérimentales au cours des fixations d'ions.

En conclusion, l'étude des fixations multiples est féconde en résultats et en hypothèses. Les modèles simplifiés ont rendu d'éminents services pour l'accumulation de données numériques utilisables, mais il serait préjuduciable pour les progrès à accomplir d'y voir autre chose qu'un artifice commode de calcul et d'interprétation de la structure d'un emplacement "moyen". Pour avoir l'espoir d'approcher la configuration détaillée, il faut chercher à déceler les inhomogénéités et si possible caractériser la fixation sur des emplacements individualisés.

□ □ □ □ □ □ □
□ □ □ □
□

DEUXIEME PARTIE

TECHNIQUES EMPLOYEES

I. MESURES DE pH ET TITRAGES POTENTIOMETRIQUES.

A/ INSTRUMENTATION.

Les mesures de pH ont été faites à l'aide d'électrodes de verre remplies par un tampon phosphate M/15, équimoléculaire en phosphate monopotassique^{et} phosphate disodique, saturé de KCl. Dans ce liquide plonge une électrode au calomel à KCl saturé. L'électrode de référence est constituée par une électrode au calomel indentique et un pont de KCl saturé. Les faibles variations de potentiel des deux électrodes au calomel avec la température s'annulent.

L'appareillage de mesure comprend un amplificateur MECI pour courant continu et un potentiomètre enregistreur de même marque. Chaque point expérimental a été enregistré pendant 3 à 5 minutes. Dans ces conditions l'enregistrement permet de vérifier l'équilibre du système. Après la première minute le potentiel ne change pas de plus d'un millivolt pendant la durée de l'enregistrement, et si dans des milieux peu tamponnés on observe des petites oscillations de $\pm 2\text{mV}$ l'enregistrement permet de déterminer la valeur moyenne à $\pm 0.5\text{ mV}$ près. Dans ces conditions les différences de pH entre deux points voisins peuvent être déterminés à $\pm 0,02$ unités près et les erreurs

maxima sur la valeur absolue du pH sont inférieures à $\pm 0,05$ unités.

B. METHODE.

Les expériences ont été exécutées dans un petit récipient de 5 ml. de volume utile à température constante $25^{\circ} \pm 0,1$. Le récipient est complètement fermé et le liquide est maintenu sous une légère surpression d'hydrogène (10 à 15 cm. d'eau) de façon à empêcher toute rentrée d'air et toute contamination par le CO_2 atmosphérique. Avant et après chaque expérience les électrodes sont étalonnées sur un tampon selon Sørensen. Un barbotage soigneux au début de l'expérience a chassé le CO_2 dissout. Les additions de réactif sont faites avec une microseringue Agla graduée en 0,0002 ml. avec un ajutage en verre Pyrex dont le bec plonge dans la solution.

Ce bec a été étiré en capillaire très fin de façon à rendre négligeable la diffusion du réactif dans l'intervalle des additions. Chaque addition correspond au moins à 5 graduations de la microseringue. Le volume total de réactif ajouté en fin d'expérience est en général de 2 à 4% du volume initial de la solution. A chaque addition l'homogénéité est obtenue par barbotage d'hydrogène. L'erreur est de l'ordre de $0,4 \mu\text{l}$ sur 100 à $200 \mu\text{l}$ de réactif ajouté au cours d'une expérience.

II. POLAROGRAPHIE.

La polarographie (Heyrowsky) ou voltammétrie (Kolthoff et Lingane 93) est l'étude des variations d'intensité du courant en fonction de la tension appliquée à deux électrodes l'une très polarisable, l'autre impolarisable, plongeant dans un électrolyte.

L'électrode polarisable idéale pour cette étude est l'élec-

trode à goutte de mercure dont la surface se renouvelle en permanence. Le tracé tension-intensité (fig. I) est une courbe en S dont la hauteur est proportionnelle à la concentration de la substance réductible.

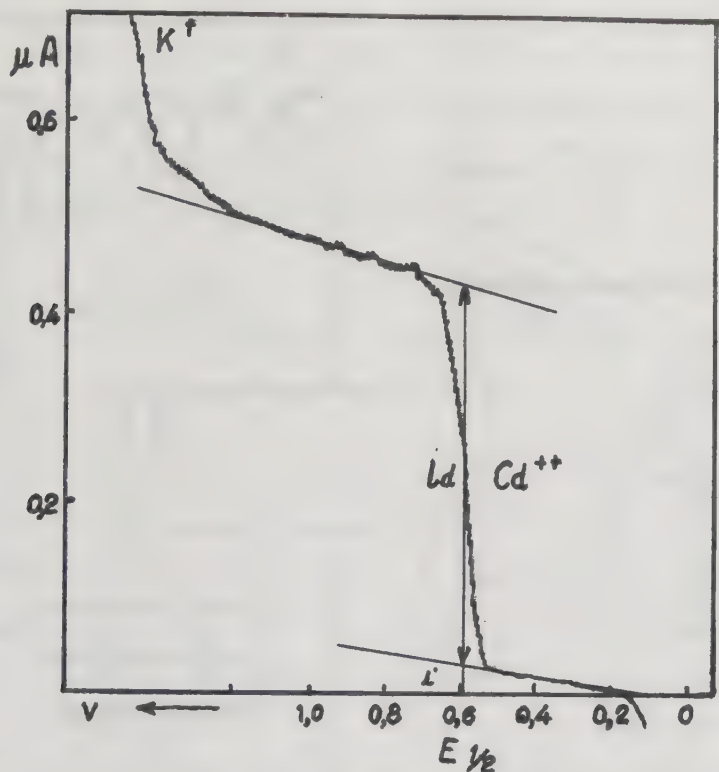


FIGURE I

Polarogramme d'une solution de CdCl_2 .

A. INSTRUMENTATION.

L'appareillage employé (fig.2) comporte un amplificateur A à courant continu et un potentiomètre enregistreur E auquel a été ajouté un montage comportant un système de polarisation F, alimenté par une batterie d'accumulateurs B, et contrôlé par un voltmètre V; un ensemble de 3 décades de résistance R allant de 1000Ω à $1 \text{ M}\Omega$ aux bornes desquelles la chute de tension provoquée par le passage du courant polarographique est mesurée. Un système de filtrage O composé de

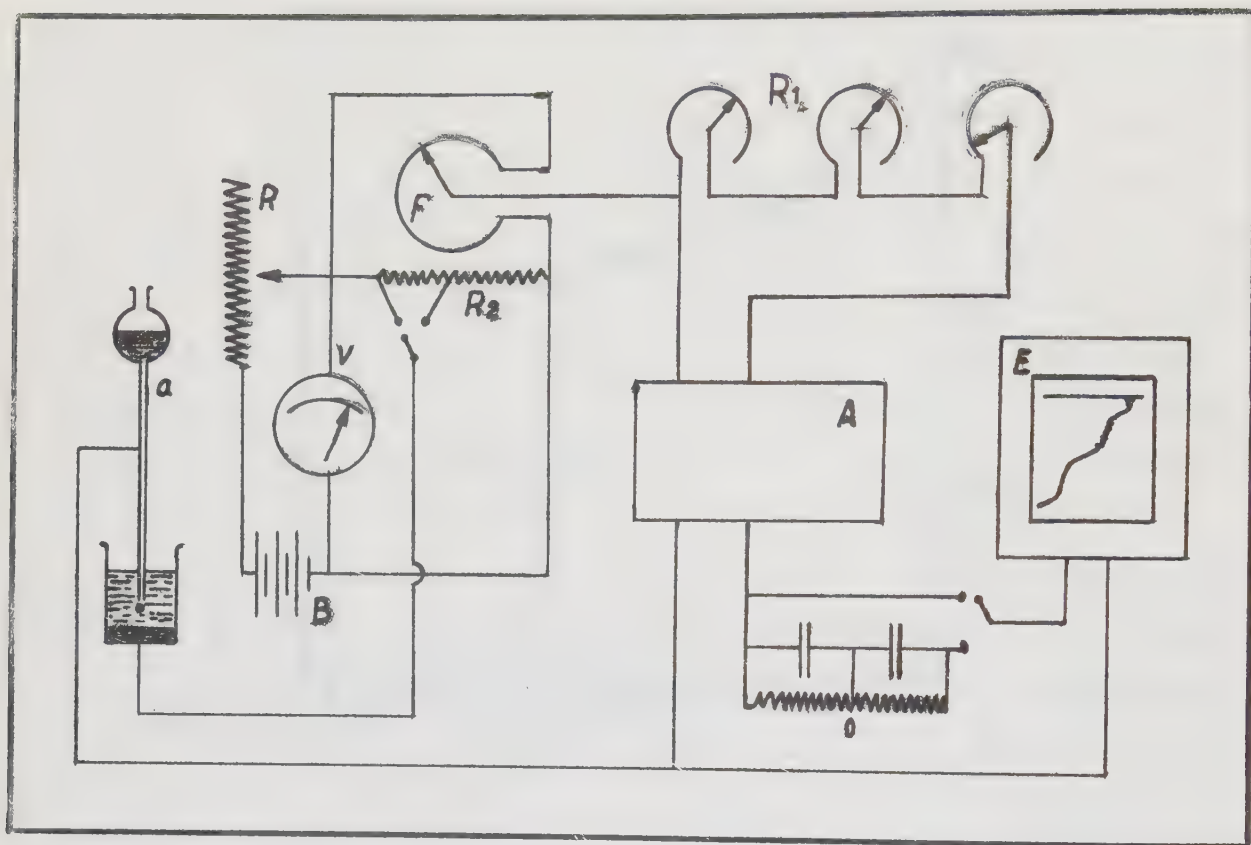


Figure 2. Schéma du montage du polarographe .

B : Batterie d'accumulateurs.

R : Rhéostat de réglage de la tension d'alimentation.

F : Fil calibré tournant. Le curseur prélève la tension de polarisation.

R_2 : Résistances permettant de changer la gamme de tension.

R_1 : Résistance donnant une chute de potentiel proportionnel au courant polarographique.

A : Amplificateur de courant continu.

E : Potentiomètre enregistreur.

O : Amortisseur d'oscillations.

a : Electrode à goutte de mercure.

résistances et de condensateurs est destiné à amortir les oscillations du courant dûs à la variation de la surface des gouttes de mercure.

Le polariseur comporte un fil calibré en spirale d'une résistance totale de $200\ \Omega$ fixé sur la périphérie d'un disque mû par un moteur synchrone faisant un tour en 25 minutes. Aux bornes de ce fil calibré on applique une tension de 2,5V. Un curseur prélève sur ce voltage une tension qui varie uniformément avec la rotation du fil calibré; il est connecté à l'électrode à goutte de mercure. L'autre électrode est portée soit au potentiel d'une des extrémités du fil calibré quand on veut varier la différence de potentiel dans la cellule polarographique de 0 à 2,5 V soit au potentiel de -0,625 V, quand on fait le polarogramme de + 0,625 à - 1,875 V. Le système d'amortissement des oscillations est placé à la sortie de l'amplificateur et ainsi ne se répercute pas sur la tension superficielle du mercure.

La résistance à travers laquelle on mesure la chute de potentiel peut être varier de 10^3 à $10^6\ \Omega$. Le cadran du potentiomètre enregistreur est gradué à 200 mV. Aux plus grandes sensibilités une variation de 4 mV de l'appareil indicateur est décelable malgré les oscillations inévitables, ce qui donne un seuil de sensibilité de l'appareil: $I = V/R = 4 \times 10^{-3} / 10^6 = 4 \times 10^{-9}\ \text{A}$ ou $0,004\ \mu\text{A}$.

Avec une des électrodes à goutte de mercure employée ceci correspond à une concentration de cadmium de $1,0 \cdot 10^{-6}\ \text{M}$,

L'erreur relative de ces mesures est de l'ordre de 3%, mais la plupart des causes d'erreur sont communes à tous les points d'une même expérience (température; viscosité, volume initial, débit de mercure et durée des gouttes) de sorte que les diffé-

rences de l'ordre de 1% entre deux points expérimentaux de viennent significatives.

B. METHODES.

Nous avons construit une courbe détalonnage pour chaque série d'expériences à la même force ionique que l'expérience, ce qui nous permet de lire directement les concentrations sans appliquer à chaque fois les corrections habituelles dues à la chute de potentiel à travers l'électrolyte et au courant résiduel.

Cependant il faut examiner l'incidence sur les mesures de deux phénomènes qui sont propres à la polarographie en milieu protéinique.

1) L'effet de viscosité des solutions aqueuses de protéines semble négligeable d'après l'expérience. En effet dans de nombreux cas où il ne se produit pas de fixation du corps réductible sur la protéine, on obtient un courant de diffusion égal à celui obtenu en l'absence de protéine dans la limite des erreurs d'expériences (127). Ce fait peut être dû à la taille très grande des molécules de protéine par rapport à la taille des molécules ou ions réductibles. Les lois qui déterminent la vitesse de ces particules considérées comme des sphères rigides, partent de l'hypothèse que le solvant peut être considéré comme continu par rapport à ces sphères. La présence d'une protéine ne modifie pas la nature du solvant et sa viscosité. Les molécules de protéine n'interviennent pour freiner la diffusion que par les collisions relativement rares et, proportionnelles au volume relatif occupé par ces protéines, qui devient négligeable dans les solutions de 1 % ou plus diluées. De plus il est permis de supposer qu'au voisinage de l'électrode à goutte de mercure négativement chargée, les molé-

cules de protéine portant une charge nette également négative (du côté alcalin du point isoinique) sont à une concentration moindre que dans le sein de la solution. Le cas est inverse avec les protéines positivement chargées. En effet, du côté acide du point isoinique la sérumalbumine modifie notablement la forme de la courbe courant-tension (128) qui perd sa symétrie autour du point d'inflexion, symétrie habituelle dans le cas des processus réversibles. Dans ce cas la courbe s'incurve au dessus du point d'inflexion: et le palier du courant de diffusion n'est atteint que pour des tensions beaucoup plus élevées.

Tanford attribue ce phénomène à l'adsorption de la sérumalbumine, mais il semble que ce ne soit pas le phénomène dominant. En effet l'adsorption existe également aux pH plus élevés que le point isoinique alors que la forme de la courbe approche sensiblement de la forme théorique.

2) L'adsorption des protéines sur la surface du mercure se manifeste par le fait que les gouttes qui tombent sur la surface de mercure formant l'électrode peu polarisable, ne fusionnent pas avec elle mais restent isolées un temps indéfini. Un certain volume de liquide se trouve ainsi immobilisé dans les interstices des gouttelettes. Ceci peut à la longue modifier la concentration de protéine restant en solution. Cependant la durée de nos expériences et le débit de mercure sont tels que cette variation n'est pas sensible. Ce qui est beaucoup plus préjudiciable à la précision de l'expérience est le fait que cet adsorption change la tension superficielle du mercure et par conséquent la taille et la durée de vie des gouttes. Dans l'équation d'Ilkovic le courant de diffusion varie avec la racine 6ème de la durée de vie des gouttes de mercure et par conséquent une variation de cette durée de 5 à 10%

peut être négligée dans la plupart de nos expériences (95).

III. PREPARATION DE LA SERUMALBUMINE.

La sérumalbumine de boeuf a été préparée selon la méthode VI de Cohn (27), suivie d'une précipitation supplémentaire dans les mêmes conditions de pH, de force ionique, de concentration en alcool et à la même température que la première précipitation de la fraction V. Le précipité redissous dans de l'eau bi-distillée a été lyophilisé et conservé à +4°. Pour l'utilisation, une quantité pesée de Fr V est dissoute dans de l'eau bidistillée et dialysée pendant 72 à 96 heures à +4° contre un grand volume d'eau bidistillée renouvelé 2 à 3 fois. Après dialyse un léger précipité, formé probablement par des euglobulines, est centrifugé. Une partie aliquote desséchée 24 heures à 110° est pesée pour déterminer la concentration. La solution limpide se conserve 8 jours à la glacière. Quelques expériences ont été faites avec un échantillon de fraction V fourni par les Etablissements Armour de Chicago. Nous avons vérifié que par titrage potentiométrique en eau bidistillée, ou en présence de diverses concentrations de chlorures alcalins et alcalinoterreux, les deux préparations se comportaient de façon identique. Nous n'avons pas utilisé la sérumalbumine cristallisée et la proportion d'impureté de notre préparation peut être estimée à 3% constituée surtout de globulines β et α . Comme il a été constaté par de nombreux auteurs (80,22) ces globulines ont un pouvoir de fixation très inférieur à celui de la sérumalbumine. Leur présence n'est donc pas une cause d'erreur considérable dans nos expériences. D'un autre côté la sérumalbumine cristallisée tout en contenant moins d'impuretés protéiniques peut avoir un comportement très variable

selon la nature de l'adjuvant de cristallisation employé (86, 120). Elle ne doit pas être considérée comme une substance de référence reproductible pour des expériences de fixation.

Le poids moléculaire de la sérumalbumine adopté pour les calculs est de 69.000.

IV. PREPARATION DE LA β -LACTOGLOBULINE.

La β -lactoglobuline a été préparée par la méthode de Cecil et Ogston (24) légèrement modifiée. Le second précipité contenant la β -lactoglobuline a été séparé par centrifugation et redissout dans un tampon acétate 0,2M à pH 5,2. La dialyse a été faite contre ce même tampon puis contre de l'eau bidistillée. Le même tampon a servi à redissoudre les cristaux avant une deuxième cristallisation. Les cristaux conservés à +2° en présence de toluène ont été lavés une fois à l'eau bidistillée avant l'utilisation.

Le poids moléculaire de la β -lactoglobuline adopté pour les calculs a été de 39.000 (Pedersen 109) .

■ ■ ■ ■ ■
■ ■ ■
■

T R O I S I E M E P A R T I E.

RESULTATS DE LA METHODE POTENTIOMETRIQUE.

Les titrages potentiométriques relatés ici n'embrassent pas la totalité des fonctions titrables de la protéine mais partent en général d'une protéine isoionique pour aboutir à pH 9,5 ou 10 embrassant ainsi la zone de pH dans laquelle des phénomènes d'importance biologique peuvent se produire. Ces titrages ont été exécutés par la soude décarbonatée suffisamment diluée pour éviter les fortes concentrations locales. Dans ce domaine de pH la variation de ce dernier est très rapide. C'est un domaine de passage entre deux paliers importants de la courbe de titrage totale, celui des fonctions carboxyle et celui des fonctions amine. Nous avons cherché à mettre en évidence tous les détails de cette courbe en opérant par additions de soude aussi faibles que possible.

I. ETUDE DE LA SERUMALBUMINE;

A. COURBES DE TITRAGES.

La figure 3 A montre une courbe de titrage de la sérumalbumine à 0,3% dans de l'eau bidistillée à l'aide de NaOH 0,02 M. Une zone assez bien tamponnée s'étend du point isoionique jusqu'à pH 6,0 qui représente le titrage des fonctions COOH qui n'étaient pas ionisées au point isoionique. Ensuite la pente de la courbe s'accroît pour amorcer un nouveau palier entre pH 7,0 et 8,4.

La présence de ce palier, absolument constante dans nos expériences avec les deux échantillons de sérumalbumine examinés, n'est pas soulignée dans l'abondante littérature sur les titrages de cette protéine, quoique décelable sur un certain nombre de courbes expérimentales publiées (Tanford 125, Bjornholm, Barbu et Macheboeuf 12) ou, sur des courbes reconstituées après les chiffres expérimentaux (Karush 61, Scatchard, Scheinberg et Armstrong 118). Il s'agit sans doute du titrage des fonctions imidazol de l'histidine dont le pK généralement admis est au voisinage de 6,5 à 7,0 (16, 127). La sérumalbumine de boeuf contient 16 fonctions imidazol et la longueur du palier que l'on trouve aux environs de pH 8 est tout à fait compatible avec

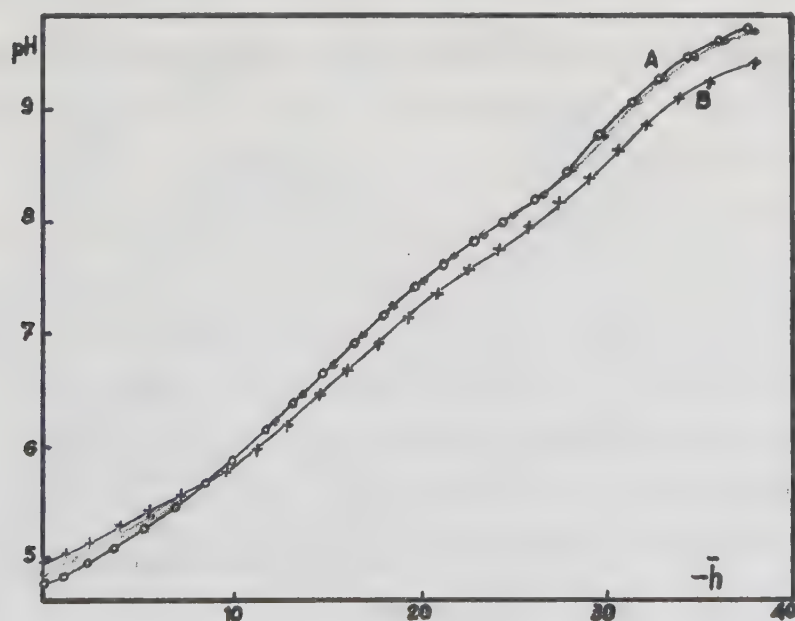


FIGURE 3.

Titration potentiométrique d'une solution de sérumalbumine à 0,3%

A. Dans l'eau distillée

B. Dans KCl 0,03 N.

ce chiffre. Une concordance rigoureuse est difficile à affirmer en raison de l'empiètement des fonctions carboxyle d'une part, des fonctions amine d'autre part sur cette zone.

La même figure 3 représente, comparée à cette première courbe, une courbe de titrage B faite à force ionique constante en présence de KCl 0,03 N; Cette courbe se trouve au dessus de la précédente dans la zone qui s'étend du point isoionique jusqu'à pH 5,7 où les deux courbes se croisent. A partir de ce point la courbe B reste au dessous de la courbe A en s'écartant progressivement.

Au niveau du palier que nous attribuons à l'imidazole, ΔpH atteint 0,2 et au début du palier de la lysine il est de 0,3.

B. INTERPRETATION DE L'ABAISSSEMENT DU pH PAR LA FORCE IONIQUE.

L'élévation du pH par addition de KCl dans la zone isoionique est imputable à la fixation d'ions Cl^- comme l'ont montré Scatchard et Black (115).

L'abaissement progressif du pH sur la courbe B par rapport à la courbe A dans les zones plus alcalines est dû principalement au fait que la force ionique modifie la contribution électrostatique au pK de toutes les fonctions ionisables, d'autant plus que la charge nette de la protéine est plus élevée. On peut se demander si cet effet rend compte de l'abaissement observé du pH ou s'il subsiste une marge, permettant de conclure à une fixation de l'ion alcalin K^+ .

L'équation déduite par Scatchard et Brown (115 appendice) exprimant le changement de pH dû à la variation de la force ionique à charge nette constante est la suivante :

$$\begin{aligned} \left(\frac{\partial pH}{\partial 2\mu} \right)_{\bar{h}} &= \frac{\left(\frac{\partial \bar{h}}{\partial 2\mu} \right)_{pH}}{\left(\frac{\partial \bar{h}}{\partial pH} \right)_{\mu}} = \frac{\frac{\partial w}{\partial 2\mu} (\bar{h}^3 - \bar{h}^2 \bar{h})}{2,303 (\bar{h}^2 - \bar{h}^2)} = \\ &= \frac{\frac{\partial w}{\partial 2\mu}}{2,303} \left[\frac{2\bar{h} + \left(\frac{\partial^2 \bar{h}}{\partial pH^2} \right)_{\mu}}{2,303 \left(\frac{\partial \bar{h}}{\partial pH} \right)_{\mu}} \right] \end{aligned}$$

En prenant pour variable indépendante $\sqrt{\mu}$;

$$\left(\frac{\partial pH}{\partial \sqrt{\mu}} \right)_{\bar{h}} = \frac{\frac{\partial w}{\partial \sqrt{\mu}}}{2,303} \left[\frac{2\bar{h} + \left(\frac{\partial^2 \bar{h}}{\partial pH^2} \right)_{\mu}}{2,303 \left(\frac{\partial \bar{h}}{\partial pH} \right)_{\mu}} \right]$$

or, pour la sérulalbumine Scatchard donne:

$$\frac{\partial w}{\partial \sqrt{\mu}} = \frac{\varepsilon^2}{2DkT} \left(\frac{x}{\sqrt{\mu}} \right) / (1+x\alpha) = \frac{1.24}{(1+10.66\sqrt{\mu})^2}$$

d'où

$$\frac{\partial pH}{\partial \sqrt{\mu}} = \frac{0.221}{(1+10.66\sqrt{\mu})^2} \left[2\bar{h} + \frac{\left(\frac{\partial^2 \bar{h}}{\partial pH^2} \right)_{\mu}}{\left(\frac{\partial \bar{h}}{\partial pH} \right)_{\mu}} \right]$$

Etant donné que les dérivées première et seconde de la courbe de titrage B, figure 3, obtenues graphiquement et représentées fig.4 et 5 varient très peu à $\bar{h}$ égal entre les courbes A et B de la figure 3, on peut les considérer en première approximation indépendantes de la force ionique. Dans ces conditions on peut faire l'intégration approchée de cette équation.

$$\Delta pH = f(\bar{h}) = \left[\frac{0.221}{1+10.66\sqrt{\mu}} \left(2\bar{h} + \frac{\frac{d^2 \bar{h}}{d pH^2}}{\frac{d \bar{h}}{d pH}} \right) \right]_{\mu_1}^{\mu_2}$$

μ correspondant à la courbe A sans sel ajouté, a été calculé selon l'hypothèse généralement admise $\mu_p = (P) \bar{h}/2$.

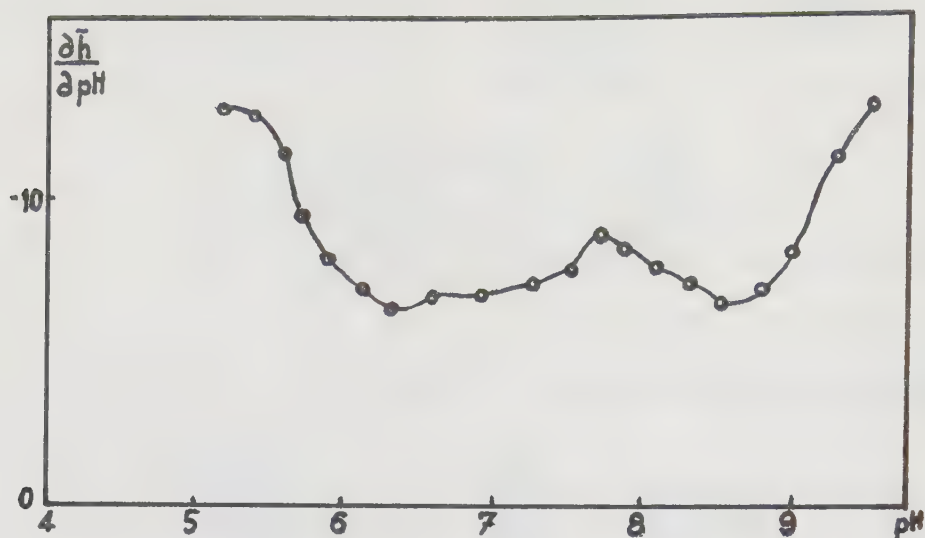


FIGURE 4. Dérivée première de la courbe de titrage B, figure 3.

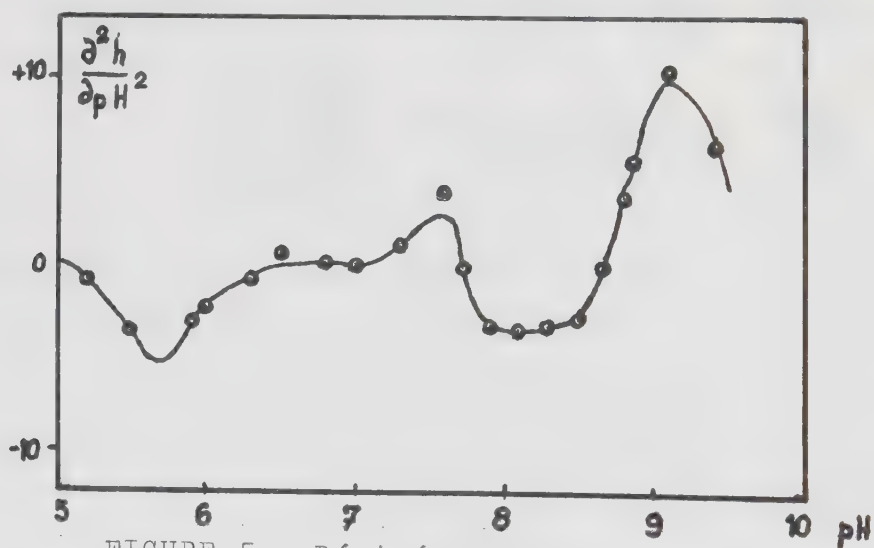


FIGURE 5. Dérivée seconde.

Le tableau II. présente les éléments de calcul et la figure 6 montre la fonction $pH = f(h)$ A: telle qu'elle résulte de ce calcul et B: telle qu'elle est déduite de l'expérience de la figure 3. La différence entre ces deux courbes près du point isionique résulte de la fixation de l'ion Cl^- . En admet-

tant que cette fixation reste constante à pH plus élevé (115) on aboutirait à une courbe assez voisine de la courbe expérimentale. La précision des résultats et des hypothèses inhérentes à la théorie n'autorise pas des conclusions formelles quant à la fixation de l'ion K^+ .

T A B L E A U II .

pH	$\bar{h}$	$\frac{\partial^2 \bar{h}}{\partial pH^2}$	$\frac{\partial \bar{h}}{\partial pH}$	$2\bar{h} + \frac{\frac{\partial^2 \bar{h}}{\partial pH^2}}{\frac{\partial \bar{h}}{\partial pH}}$	$\left[\frac{0,221}{1+10,66\sqrt{\mu}} \right] \mu_2$	ΔpH calculé
5,0	-0,5	-8	-12	-0,33	0,0132	0,04
6,0	-10	-5	-7,5	-20,67	0,0090	0,186
7,0	-18,5	-0	-7,0	-37,0	0,0080	0,295
8,0	-26,4	+3,5	-8,0	-53,2	0,0074	0,394
9,0	-33,6	-9	-8,3	-66,3	0,0068	0,450
9,2	-35,5	-12	11	-70	0,0067	0,470

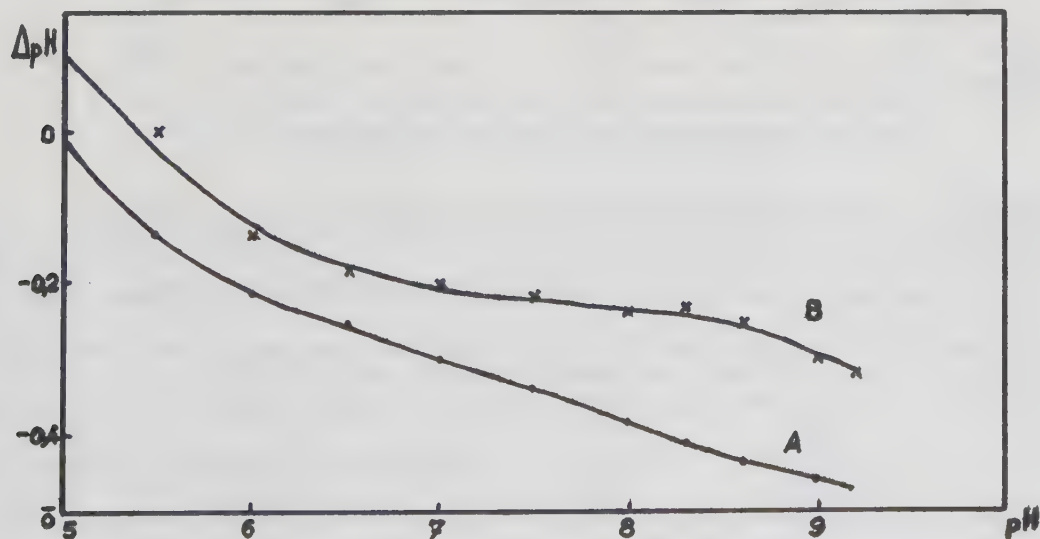


FIGURE 6. Abaissement du pH par la force ionique.

A: calculé

B: expérimental

tant que cette fixation reste constante à pH plus élevé (115) on aboutirait à une courbe assez voisine de la courbe expérimentale. La précision des résultats et des hypothèses inhérentes à la théorie n'autorise pas des conclusions formelles quant à la fixation de l'ion K^+ .

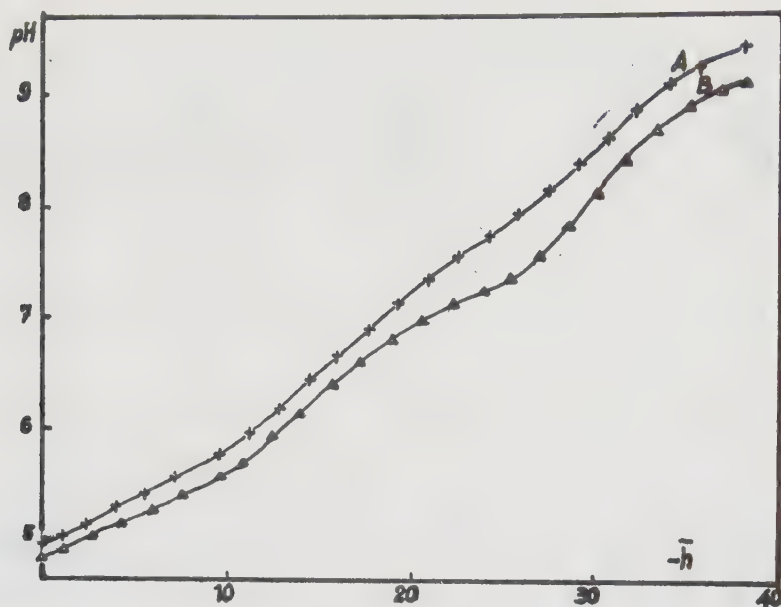


FIGURE 7. Courbes de titrage de sérumalbumine.
A: en présence de KCl 0,03 M (cf. figure 3 B)
B: en présence de $CaCl_2$ 0,01 M.

C. TITRAGES POTENTIOEOMETRIQUES EN PRESENCE DE CALCIUM.

La figure 7. représente deux courbes de titrage potentiométriques faites dans des conditions de température de concentration protéique et de force ionique identiques. A a été faite en présence de KCl, B en présence de $CaCl_2$; $\mu = 29,4 \cdot 10^{-3}$. A la fin du titrage la force ionique additionnelle due à la soude est de $2,4 \cdot 10^{-3}$. La force ionique varie donc faiblement le long du titrage mais faisant abstraction de la fixation différente des ions, elle est toujours identique pour les points des courbes A et B ayant la même abscisse.

La courbe B se trouve dans son ensemble au dessous de la courbe A. De plus l'écart entre ces courbes n'est pas uniformément croissant, il est surtout important au niveau du pailier des fonctions imidazol où ΔpH atteint 0,5, alors qu'au pailier des amines, il retombe à 0,3. La figure 8. représente les variations de l'abaissement du pH par la présence du calcium en fonction du nombre d'équivalents de soude ajoutés par molécule de sérumalbumine. Cette courbe met bien en évidence que les variations de ΔpH ne sont ni uniformes ni régulières. Il existe un maximum très net vers $\bar{h} = -26$ mais il semble exister un autre maximum plus faible vers $\bar{h} = -12$ séparés de l'autre par un minimum vers $\bar{h} = -18$.

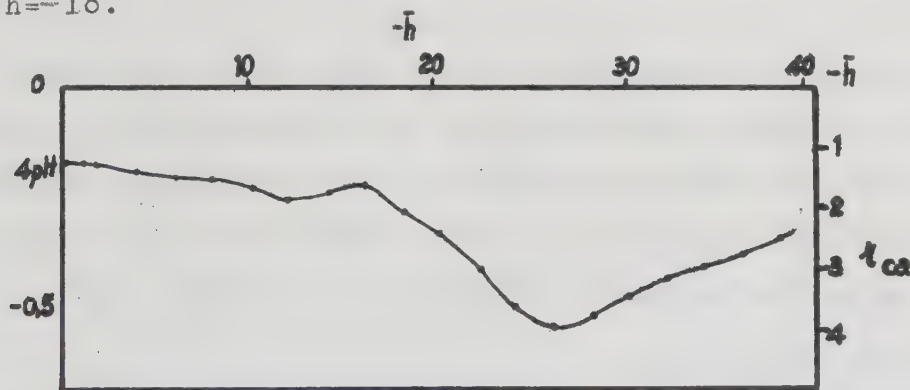


FIGURE 8. Abaissement du pH par le calcium en fonction de la charge nette initiale de la sérumalbumine.

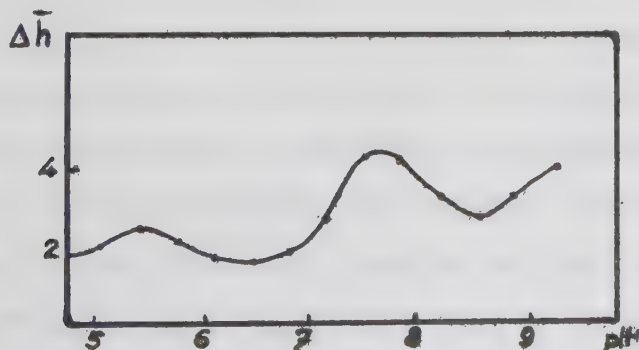


FIGURE 9. Distance horizontale entre les courbes A et B, fig. 7.

Ce comportement se distingue nettement de celui des courbes de titrage habituellement utilisées pour déceler la formation de complexes avec un ion métallique et pour calculer les constantes d'association de ces complexes. En effet dans tous ces cas, en présence d'un large excès d'ions métalliques (ce qui est le cas du calcium dans l'expérience précédente) les courbes de titrage sont abaissées de façon parallèle le long de l'axe des pH, et ΔpH reste constant.

De telles courbes ont été étudiées par Cannan et Kibrick (17), dans le cas de la formation de complexes entre les ions métalliques bivalents et les acides carboxyliques. Ces auteurs ont montré que ces complexes sont possibles même entre les acides aliphatiques et les ions alcalinoterreux, mais ils sont fortement favorisés par la présence d'un oxhydryl en α . Dans les protéines il n'existe pas de chaînes latérales α -hydroxy-carboxyliques, mais la présence de deux chaînes latérales acides voisines peut également aboutir à la stabilisation de tels complexes.

Les travaux de J. Bjerrum (9) concernant la formation de complexes covalents entre métaux et amines, ont rassemblé et complété les bases mathématiques du calcul des constantes d'affinité à partir du déplacement du pH. Mais ces complexes ne sont pas possibles avec les métaux alcalinoterreux. Les méthodes de calcul n'en seraient pas moins applicables à la formation de complexes de nature différente et en particulier à celles existant entre les protéines et le calcium, si la présence dans les protéines d'un très grand nombre de fonctions ionisables de pK variés ne venait compliquer l'interprétation.

Nous avons représenté également figure 9, Δh en fonction du pH des courbes A et B de la figure 7, c'est-à-dire les distances horizontales entre points d'égal pH de ces deux courbes. C'est la quantité de soude qu'il faudrait ajouter pour remonter le pH à son niveau initial quand il aura été abaissé par l'échange du K^+ présent contre une quantité équivalente de Ca^{++} . Sur cette courbe on distingue deux minima et deux maxima.

La figure 10 représente un réseau de courbes de titrage potentiométrique. La courbe de gauche représente le titrage potentiométrique d'une solution de sérumalbumine par la soude en présence de KCl 0,02 N.

D'autres échantillons identiques de sérumalbumine portés au pH correspondant aux points A B C D E F G H I J ont été additionnés de quantités successives de chlorure de calcium, et le pH a été mesuré dans les mêmes conditions. Ceci donne les courbes transversales de réseau. Enfin en réunissant les points de ces courbes transversales correspondant à la même concentration en calcium on reconstitue une famille de courbes de titrages potentiométriques que l'on aurait pu obtenir en titrant par la soude des solutions contenant les quantités correspondantes de calcium; chacune étant décalée le long des abscisses d'une distance proportionnelle à la concentration en calcium. La forme de ces courbes résultantes se superpose à d'autres courbes exécutées effectivement dans l'ordre inverse: addition unique de sels de calcium suivie de titrage par la soude.

Un simple examen des courbes transversales révèle: 1°) que l'abaissement du pH est variable selon le pH initial, 2°) que l'allure même de ces courbes est variable. On ne peut pas les superposer par simple changement de coordonnées. Ces courbes suggèrent que selon la charge nette de la protéine son affinité

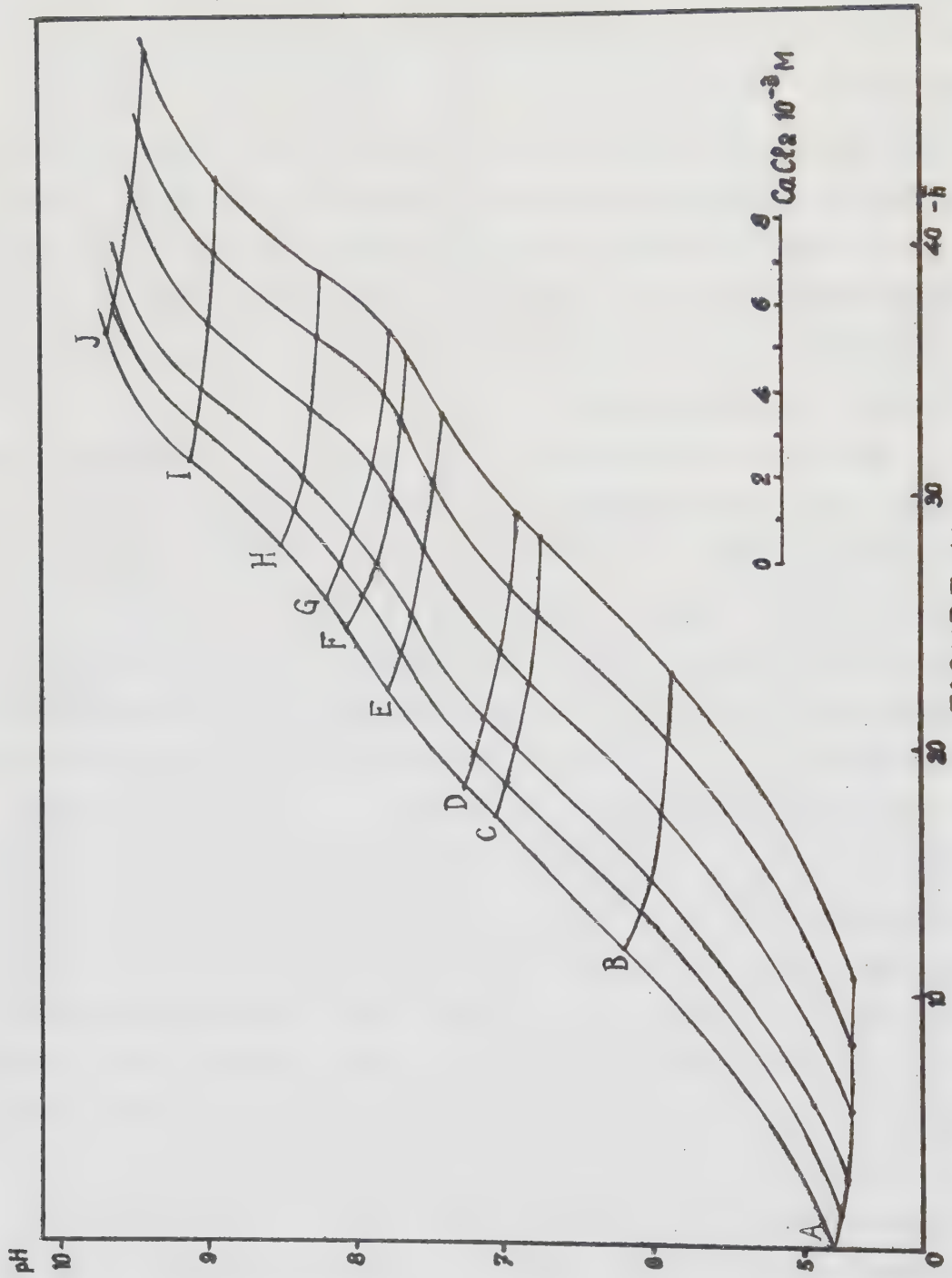


FIGURE 10
Réseau de courbes de titrage de sérualbumine en présence
de concentrations variables de CaCl_2 .

pour le calcium change en même temps que le nombre des emplacements et probablement la nature même de l'ion fixé. On peut admettre en effet que dans la zone neutre Ca^{++} et Cl^- se fixent à des emplacements indépendants, alors qu'à pH alcalin il y a fixation de CaOH^+ .

D. TENTATIVES D'INTERPRETATION DE L'ABAISSMENT DU pH PAR FIXATION DU CALCIUM.

1) Théorie de Scatchard. Nous allons essayer d'appliquer la théorie développée par Scatchard et Black (115) pour calculer la fixation des anions par l'élévation du pH isoionique d'une solution de sérumalbumine.

Cette théorie est basée sur l'hypothèse que la fixation d'un anion modifie les constantes de dissociation des groupes ionisables en raison de la charge nette supplémentaire apportée à la protéine selon la théorie de Debye Hückel.

$$K_h = K_h^0 e^{2wZ}$$

où K_h^0 est la constante de dissociation intrinsèque d'un groupe ionisable

K_h est cette constante modifiée par l'énergie électrostatique

Z est la charge moyenne d'une molécule de protéine

w est défini page 15.

Le nombre total des protons associés par molécule de protéine sera:

$$\bar{h} = \sum_{h=1}^n \frac{K_h (H^+)}{1 + K_h (H^+)}$$

n est le nombre des fonctions ionisables.

Comme (H^+) est identique pour tous les termes de la somme et les K_h varient tous dans la même proportion avec la charge

$$(H^+) = (H^+)^0 e^{-2w(z - z^0)}$$

donc

$$\text{pH} = \frac{2w}{2,303} \Delta Z$$

ou, si ΔZ est dû uniquement à la fixation d'anions de charge

I en nombre moyen r par molécule

$$\Delta_{pH} = \frac{2w}{2,303} \Delta r; \quad \text{ou } \Delta r = \frac{2,303}{2w} \Delta_{pH} \quad (9)$$

Ceci est valable quand w est constante c'est-à-dire par comparaison de deux solutions de force ionique identique mais contenant des anions différentes.

Appliquée au cas du calcium, cation bivalent, cette équation s'écrit :

$$r_{Ca} = - \frac{2,303}{4w} \Delta_{pH} \quad (9')$$

w se rapportant à la fixation de l'ion hydrogène a ici la même valeur que dans l'équation (6) page 15, c'est ΔZ qui a une valeur double pour un ion bivalent.

En toute rigueur il faudrait écrire :

$$\underbrace{(r_{Ca} - 1/2 r_{Cl})}_B - \underbrace{(1/2 r_K - 1/2 r_{Cl})}_A = - \frac{2,303}{4w} \underbrace{\Delta_{pH}}_{A-B}$$

Les deux termes en r_{Cl} ne s'annulent pas rigoureusement. En effet la concentration en ions Cl^- dans les conditions de la courbe B (fig.7) n'est que 2/3 de celle présente dans l'expérience A. Ne pouvant en tenir compte avec exactitude nous négligeons la différence de fixation de Cl^- en première approximation.

Ainsi on obtient à toute valeur du pH initial un nombre d'ions Ca^{++} fixée proportionnel au Δ_{pH} , et la courbe fig. 8 représente également les variations de r_{Ca} en fonction de $\bar{H}$ (échelle des ordonnées à droite).

Cette courbe présente des maxima et des minima, elle tend donc à faire admettre que la fixation du calcium n'est pas uniformément croissante avec le pH.

Une telle conclusion appelle quelques réserves. Le traitement de SCATCHARD s'applique aux anions qui ne peuvent pas

entrer en compétition avec l'ion H^+ . L'ion OH^- n'a pas les mêmes aptitudes réactionnelles que H^+ donc une compétition possible entre l'anion et OH^- n'a pas un sens précis.

Le cas est très différent quand il s'agit de la fixation d'un cation. L'analogie avec la fixation d'un anion ne peut être avancée que dans le cas où la fixation du cation aurait lieu uniquement sur les emplacements carboxyliques, à un pH où toutes ces fonctions sont dissociées et où par conséquent une compétition directe entre Ca^{++} et H^+ serait exclue. Il ne semble pas que la situation soit aussi simple.

2) Méthode d'extrapolation vers une concentration nulle en protine. En admettant que dans toute solution de sérumalbumine ayant la même charge nette la fixation d'un même nombre d'ions calcium par molécule provoque le même abaissement du pH on peut déterminer par extrapolation la concentration de calcium libre.

Ceci revient à admettre que l'abaissement du pH est une fonction univoque du nombre d'ions calcium fixés par molécule

$$r = f(\Delta pH) \quad (10)$$

Comme d'autre part quelle que soit la forme donnée à la loi d'action de masse r est une fonction univoque de la concentration de calcium libre on peut écrire:

$$(Ca^{++}_{\text{libre}}) = g(\Delta pH)$$

La conservation du calcium répond à l'équation:

$$Ca_{\text{tot}} = r(P) + Ca^{++}_{\text{libre}} = f(\Delta pH)(P) + g(\Delta pH) \quad (11)$$

On voit donc qu'en portant le calcium total nécessaire pour obtenir le même abaissement de pH pour un même pH initial en fonction de la concentration de protéine on doit obtenir une droite qui coupe l'axe des ordonnées en $g(\Delta pH) = Ca^{++}_{\text{libre}}$ et dont la pente est $f(\Delta pH) = r_{Ca}$.

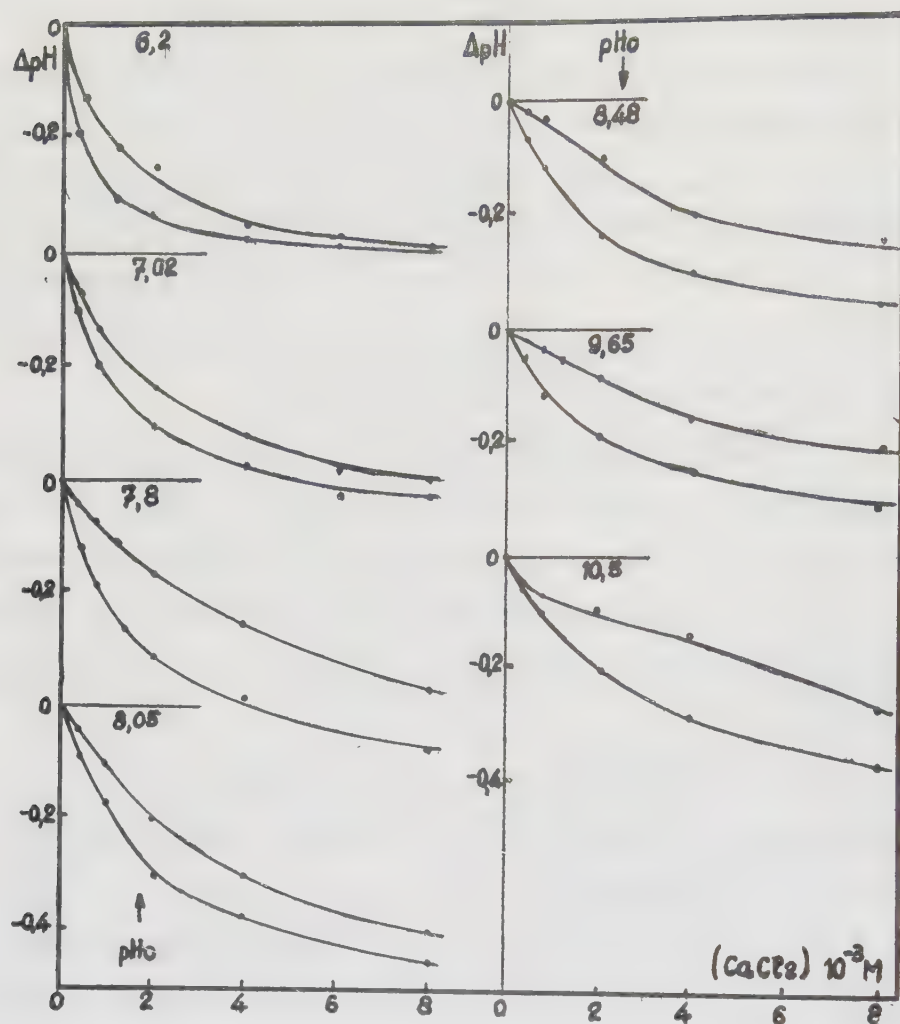


FIGURE II. Abaissement du pH de solutions de sérumalbumine en fonction de la concentration de CaCl_2 ajouté. Les concentrations en sérumalbumine sont, de $P_1 = 1,1 \cdot 10^{-4}$ M. pour les courbes supérieures, $P_2 = 5,5 \cdot 10^{-4}$ M. pour les courbes inférieures. Le pH initial identique pour les deux solutions est marqué au-dessus de chaque paire de courbes.

Semblable méthode d'extrapolation a été employée par Chanutin Ludevig et Masket (25) dans leurs expériences d'ultracentrifugation, à ceci près que dans leurs prises d'essai l'égalité des concentrations en calcium libre n'est pas basée sur l'hypothèse (10).

10

Expérimentalement on amène une solution de protéine à un pH donné par la soude. De cette solution on fait plusieurs dilutions à l'eau bidistillée neutre et pour chacune de ces dilutions on établit la courbe de ΔpH en fonction de la concentration de $CaCl_2$ ajouté.

Le pH initial des dilutions reste invariable si l'on travaille dans des conditions de propreté rigoureuse.

Cependant au dessus de pH 8, nous avons préféré partir d'une solution isoionique dans chaque expérience et ajuster le pH initial par la soude à la même valeur à 1 mV près, pour 2 dilutions différentes de protéine.

Chacun de ces échantillons est additionné de quantités successives de $CaCl_2$ et le pH mesuré avec grand soin.

La figure 11 représente les familles de courbes

$$\Delta pH = f (Ca_{tot})$$

ainsi obtenues pour 7 valeurs différentes du pH initial.

Pour l'extrapolation nous avons utilisé la partie moyenne de ces courbes entre $pH = -6$ mV et $pH = 18$ mV où la pente de ces courbes est suffisamment marquée.

La figure 12 montre plusieurs exemples des droites:

$$Ca_{tot} = f (P) \Delta pH$$

ayant servi à l'extrapolation.

A titre d'exemple au pH initial de 7,8 et à $\Delta pH = -14$ mV ± 1 mV pour une des valeurs r_{Ca} connues avec la meilleure précision le calcul d'erreur donne:

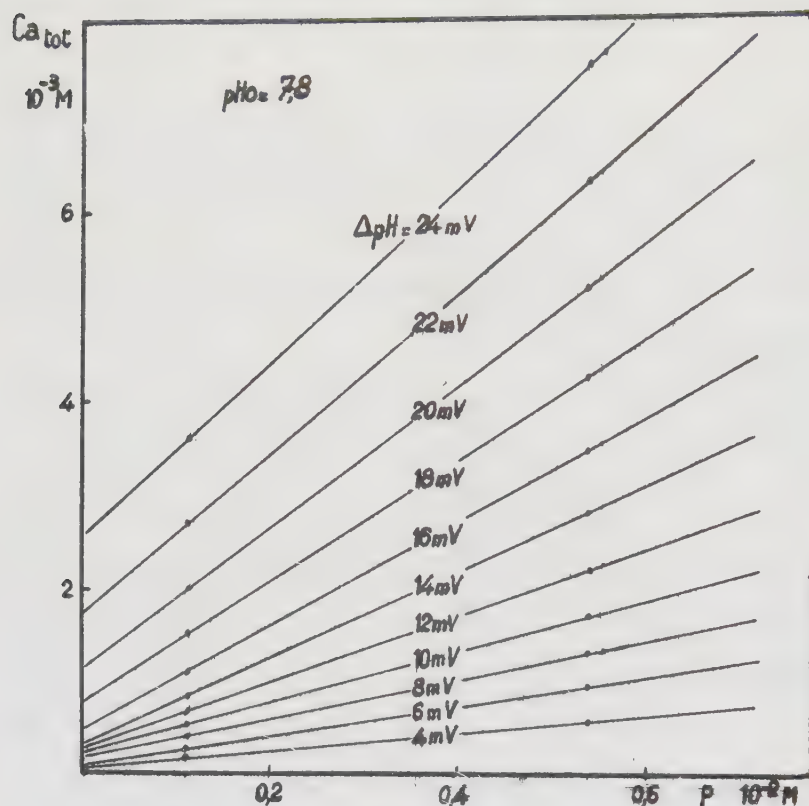


FIGURE 12. Droites d'extrapolation représentant l'équation (11) p 51. données de la figure II pH = 7,8.

T A B L E A U III.

pH°	(-H ⁺)	ΔpH (mV)	(Ca ⁺⁺) 10 ⁻³ M	r (Ca)
6,2	12	-17,4	1,30	3,83
7,02	17	-13,4	0,920	5,40
7,16	18,5	-15	0,510	9,8
7,8	23,5	-14,5	0,370	13,5
8,05	25	-19	0,660	7,4
8,48	26,5	-12,5	0,860	5,8
9,65	37	-10	0,560	8,9
10,5	41	-8	0,404	12,5

$$r_{Ca} = 4,84 \pm 0,58 \text{ soit } \pm 12 \%$$

L'erreur expérimentale probable peut être estimée inférieure à ce chiffre pour ce cas particulier, par contre pour d'autres points où ΔpH est plus petit ou plus grand, l'erreur relative peut dépasser notablement 12 %.

Ainsi la méthode n'est pas appropriée à la détermination du nombre total des emplacements.

Le tableau III. donne pour différents pH initiaux les valeurs de ΔpH , de Ca_{libre}^{++} et de $\frac{r_{Ca}}{Ca_{\text{libre}}^{++}}$ pour une valeur calculée de $r_{Ca} = 5$ qui se trouve sur la partie la plus favorable de ces courbes. Plus loin nous discuterons la validité de ces déterminations en fonction des hypothèses qui sont à leur base. Signalons dès maintenant que ce calcul aboutit à des fixations de calcium plus fortes que celles signalées précédemment (52,100,64), mais une partie de cette discordance peut s'expliquer par le fait que les précédentes déterminations ont été faites en présence de concentrations de chlorures alcalins, de l'ordre de 0,1 N. (20)

E. TITRAGES POTENTIOMETRIQUES EN PRESENCE DE BARYUM ET DE MAGNESIUM.

La figure 13 représente deux titrages potentiométriques l'un en l'absence, l'autre en présence d'ions Ba^{++} à la concentration 0,03 et la figure 14 deux titrages analogues en présence de chlorure de Mg à la même concentration. Ces figures correspondent à la figure 7 concernant le Ca et on peut remarquer l'analogie très étroite entre l'action de ces trois espèces d'ions alcalinoterreux. Il semble que le Mg se fixe un peu plus faiblement que les deux autres. Il est à noter qu'on n'observe aucune précipitation au cours de ces titrages ce qui prouve d'une part une élimination satisfaisante des carbonates et d'

autre part la solubilité des complexes formées avec les protéines dans cette zone de concentration et de pH.

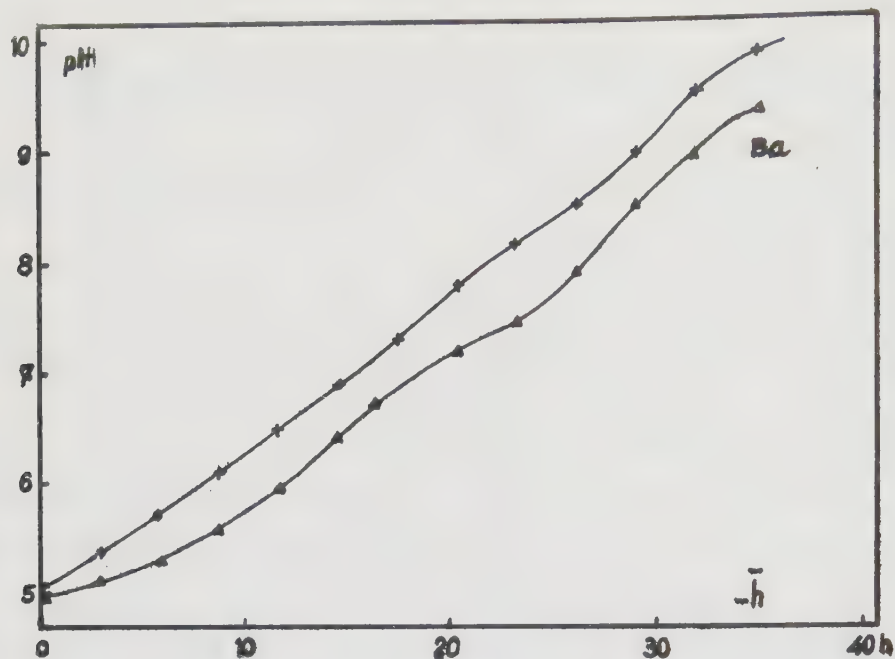


FIGURE 13.

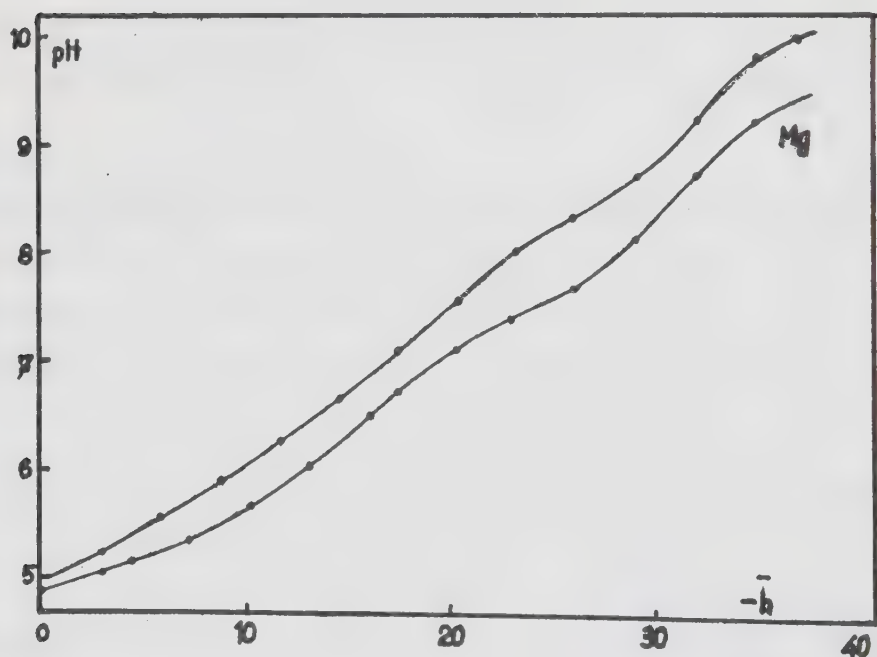


FIGURE 14.

Titrages potentiométriques de sérumalbumine, en présence de BaCl_2 0,03 M (Ba fig.13) et en présence de MgCl_2 0,03 M (Mg fig.14)
Courbes supérieures: titrages dans l'eau distillée.

TITRAGES POTENTIOMETRIQUES EN PRESENCE DE CADMIUM. La figure 15 représente un réseau de courbes de titrage de sérumbumine en présence de concentrations variables de chlorure de cadmium. Les courbes de ce réseau ont été construites de la même façon que celles de la figure 10 pour le calcium.

L'abaissement du pH est plus important avec Cd qu'avec Ca et il est obtenu pour des concentrations beaucoup plus basses du sel. La encore l'abaissement est maximum au voisinage du palier de la courbe de titrage, mais au lieu d'aboutir à une accentuation de ce palier comme dans le cas du calcium il entraîne sa disparition, dès que la concentration de Cd Cl_2 atteint 10^{-4} M. Cette concentration équivaut à un peu plus de 2 ions Cd^{2+} par molécule de sérumbumine.

Cet effacement peut être interprété comme un fort abaissement de ce palier jusqu'à un niveau qui se confond avec une ré-

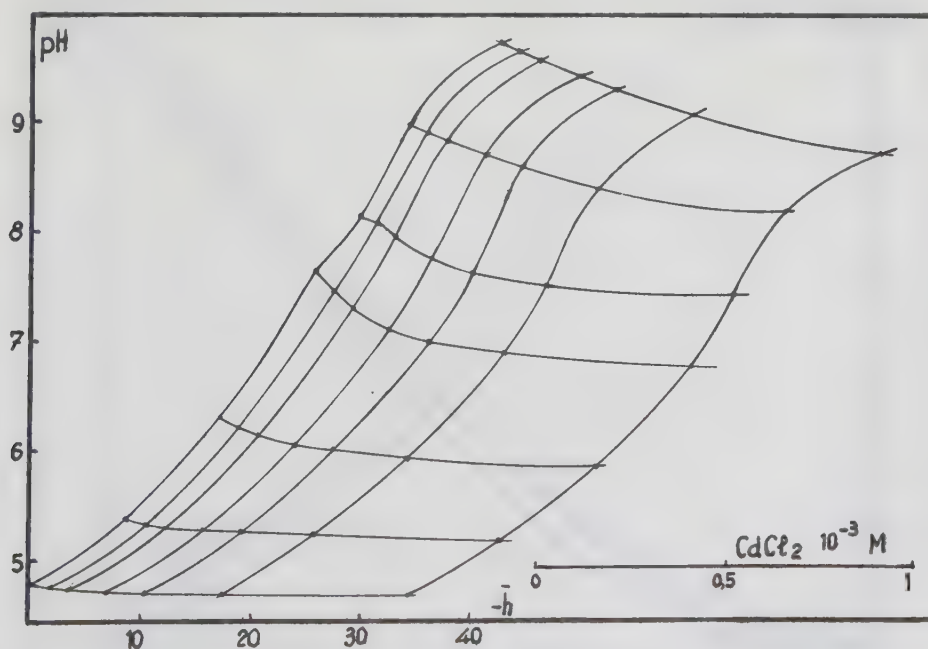


FIGURE 15. Réseau de courbes de titrage de sérumbumine en présence de concentrations variables de Cd Cl_2 .

gion plus fortement tamponnée de la courbe de titrage et en particulier avec la fin du palier des fonctions carboxyliques.

Nous avons appliqué la méthode développée à propos du calcium, sur le cadmium pour le calcul du nombre d'ions fixés par molécule d'albumine afin de confronter les résultats avec ceux données par la polarographie. Nous y reviendrons dans le chapitre suivant consacré aux résultats de la polarographie.

G. TITRAGES POTENTIOMETRIQUES EN PRESENCE DE SULFOCYANURE. La

figure 16. montre une courbe de titrage de sérumalbumine en présence de sulfocyanure de potassium, comparée à une courbe de titrage en eau distillée.

On remarque que l'ensemble de la courbe est situé au-dessus de la courbe témoin, mais ici encore, l'écart des deux courbes n'est ni constant, ni uniformément décroissant avec l'alcalinité. Cet écart en fonction de la soude ajouté, subit des variations inverses de celles observées au cours de la fixation du Ca. Il passe par un minimum au niveau du palier des imidazol.

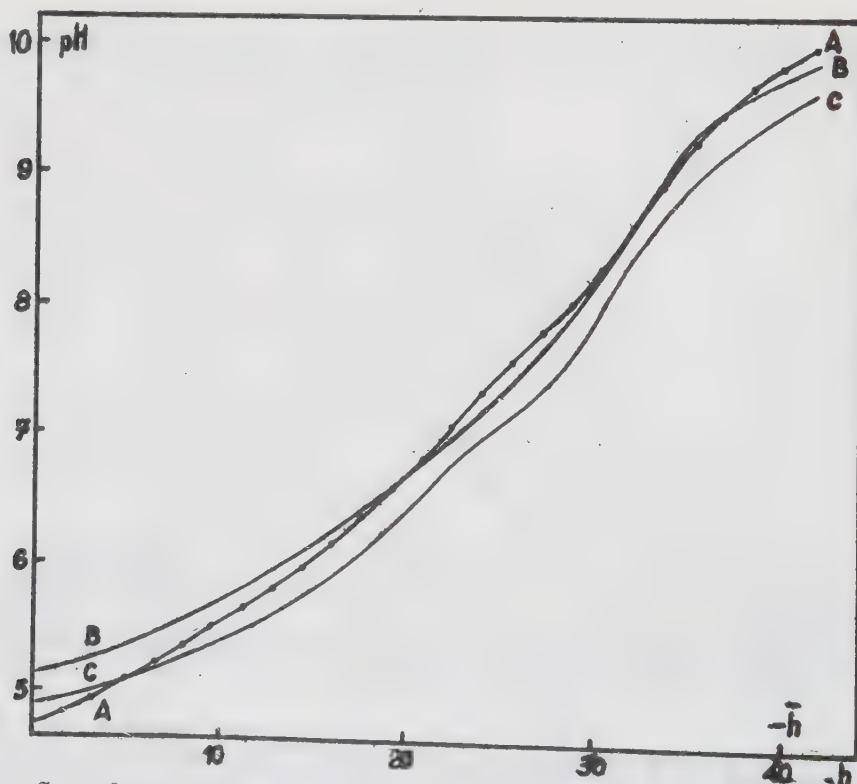


FIGURE 16. Courbes de titrage de sérumalbumine.

A dans l'eau distillée, B dans KSCN 0,2N, C dans KCl 0,2N.

II. ETUDE POTENTIOMETRIQUE DE LA β -LACTOGLOBULINE.

La figure 17 représente 3 courbes de titrage de la β -lactoglobuline du pH isoelectronique à pH 10. Cette protéine étant insoluble dans l'eau distillée, tous ces titrages sont effectués à force ionique constante $\mu = 0,2$.

On voit que le pH en présence de Ca Cl_2 est notablement abaissé par rapport à celui en présence de KCl , alors que en présence de KSCN il est très légèrement élevé. Les écarts sont trop faibles, étant donné la force ionique élevée pour que l'application de la méthode de Scatchard ou de la méthode d'extrapolation vers une concentration nulle de protéine puisse être tentée avec quelque précision. Cependant l'ensemble de ces courbes, approximativement parallèles donnent une image beaucoup moins complexe que celles de la sérumalbumine.

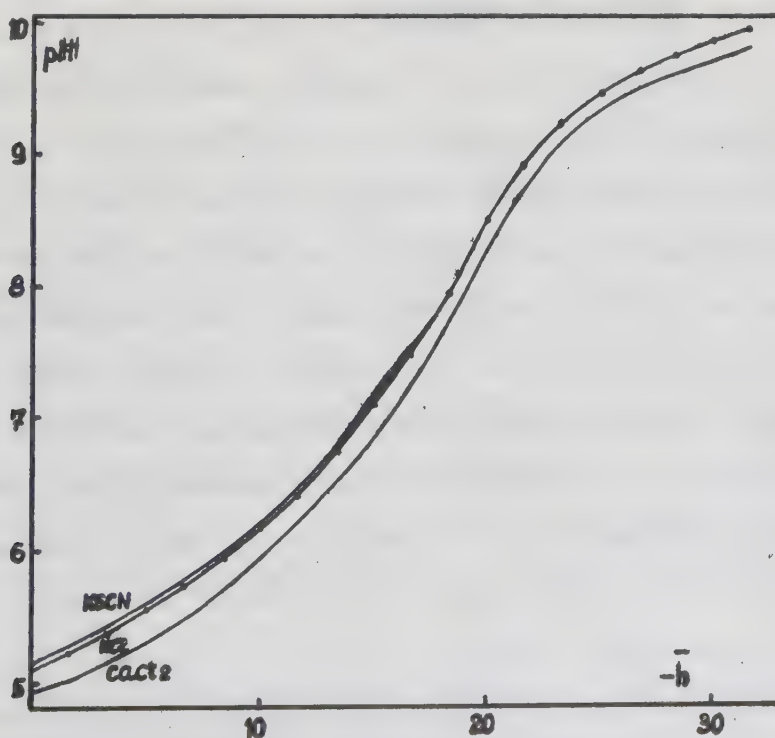


FIGURE 17. Courbes de titrage de Lactoglobuline en présence des sels indiqués. Force ionique $\mu = 0,2$ pour les 3 courbes. (Les points expérimentaux ont été supprimés pour la clarté).

III. DISCUSSION SUR LA VALEUR DE LA METHODE POTENTIOMETRIQUE POUR L'ETUDE DE LA FIXATION DES IONS.

Etant donné la facilité de mise en oeuvre de la méthode potentiométrique, son application à l'étude de la fixation des ions serait très prometteuse si l'intervention d'hypothèses simplificatrices ne venait compromettre les possibilités d'interprétation.

A. HYPOTHESES SIMPLIFICATRICES EMPLOYEES. Nous allons discuter l'effet de cinq de ces hypothèses sur la validité des résultats. Cet effet sera variable selon la méthode expérimentale et la méthode de calcul employées.

a) L'hypothèse émise par Scatchard selon laquelle la fixation d'un ion change le pH par sa seule contribution électrostatique aux pK de la protéine

$$\Delta \text{pH} = - \frac{2}{2303} \frac{w}{\Delta z} \quad (9)$$

peut être en défaut s'il y a compétition directe pour un emplacement entre l'ion fixé et l'ion H^+ ou OH^- .

b) Dans cette même formule de Scatchard, la valeur de w est calculée selon le théorie de Debye Huckel avec un modèle de protéine en sphère compacte ayant ses charges uniformément réparties à la surface. Or, w ainsi calculé est souvent en discordance avec les valeurs expérimentales. Tanford a recalculé les valeurs de w en admettant une pénétration possible des ions sous la surface de la sphère et a obtenu une meilleure concordance avec l'expérience. Cependant le choix exact du modèle reste difficile. (131)

c) En dehors du point isoionique, la force ionique influe sur le pH en l'absence de toute fixation d'ions. Les équations de Scatchard et Brown page 41 tendent à décrire cette influence mais elles comportent également l'incertitude sur la

valeur de w et de plus la contribution de la protéine à la force ionique que l'on admet généralement $\mu_p = \frac{Z(P)}{2}$ reste une hypothèse à démontrer.

d) Scatchard et Black admettent dans leurs calculs que la concentration totale d'ions ajoutés est égale à la concentration d'ions libres, ce qui introduit une erreur aux faibles concentrations.

e) Enfin dans toutes les méthodes de calcul on ne considère que la fixation d'une seule espèce ionique, alors qu'en réalité l'adjonction d'un sel neutre apporte au moins un anion et un cation. De plus, en dehors du point isoionique, l'acide ou la base utilisé peut apporter un ion différent de ceux du sel étudié. C'est le cas de nos expériences avec Ca Cl_2 où le pH initial est atteint par l'adjonction de NaOH .

B.EFFETS DE CES HYPOTHESES SUR LES RESULTATS CALCULES SELON LA METHODE DE SCATCHARD. Les expériences de Scatchard et Black ont été faites au point isoionique et leur exploitation est basée essentiellement sur les hypothèses a b d et e.

a) à toutes chances d'être exact pour les anions à ce pH, une compétition avec H^+ ou OH^- semble exclue.

b) apporte une erreur qui affecterait les chiffres de fixation d'un coefficient de proportionnalité à peu près constant

d) apporte une erreur en excès pour la valeur de la concentration en ion libre d'autant plus importante que la concentration de sel est plus faible et la concentration en protéine est plus élevée.

e) enfin semble être en défaut, en effet les chlorures de divers ions alcalins entraînent des ΔpH légèrement mais significativement différents, dûs sans doute à la fixation différente de leur cation.

Quand on applique la méthode de Scatchard sur nos expériences en dehors du point isoionique et sur le cation bivalent Ca^{++} , l'exactitude de l'hypothèse a) devient plus discutable et l'hypothèse c) introduit un élément d'incertitude supplémentaire.

B. EFFET DES HYPOTHESES SUR NOS RESULTATS CONCERNANT LA FIXATION DU Ca^{++} par la méthode d'extrapolation à concentration nulle en protéine. Dans cette méthode l'hypothèse a) est remplacée par l'hypothèse plus générale

$$\Delta \text{pH} = f(r)$$

(10)

qui inclut également le cas de compétition du cation avec H^+ et sa validité est donc plus générale. L'hypothèse b) n'intervient pas, les calculs ne nécessitent pas la connaissance de w , enfin l'hypothèse d) est abandonnée. En fait la différence de la concentration totale en ion et la concentration libre sert de base aux calculs. Par contre l'effet des hypothèses c) et e) va modifier notablement les résultats.

Dans nos calculs nous avons complètement négligé la différence initiale de force ionique entre deux solutions de protéine amenées au même pH initial. L'erreur commise est d'autant plus grande que ce pH est plus éloigné du point isoionique. C'est principalement à cette erreur que nous avons attribué le fait que nos courbes $\Delta \text{pH} = f(\text{CaCl}_2)_{\text{tot}}$ tendent à devenir parallèles au lieu de tendre vers une même asymptote, ce qui aboutit à une augmentation considérable de r_{Ca} calculé à mesure que ΔpH augmente en valeur absolue. Nous avons donc essayé, pour éliminer cet inconvénient, d'opérer en présence de KCl 0,01 N à force ionique initial égale. Les variations de PH dans ces conditions sont plus faibles ce qui augmente les erreurs expérimentales et de plus les deux courbes deviennent

parallèles beaucoup plus rapidement et r calculé tend rapidement vers l'infini. Ceci ne peut s'expliquer qu'en admettant que la fixation des ions Cl^- apportés par le KCl n'est pas négligeable, et différente pour les deux solutions de protéine au début de l'expérience. Un autre essai en présence de KCl 0,25 N était destiné à diminuer cette erreur. A cette concentration les emplacements de Cl^- sans être complètement saturés, ne prennent plus Cl^- que très lentement. Or les variations de pH étaient pratiquement nulles entre les concentrations de Ca^{++} allant de 0 à 10^{-2}M alors qu'à valeur de $\bar{h}$ égale dans l'eau distillée on observe un ΔpH allant à 0,5.

La seule explication que nous pouvons proposer est une quasi saturation des emplacements de Ca^{++} par K^+ et une réaction de simple échange entre ces deux ions, n'entraînant pas de variation du pH.

Des essais analogues avec le thiocyanate de potassium en absence d'autre sel ou en présence de KCl 10^{-2}N et de KCl à 0,2N ont abouti à des résultats analogues.

En eau distillée les courbes de ΔpH tendent à être parallèles ; en présence de KCl 0,01 N, ΔpH est plus faible et tend encore plus rapidement vers le parallélisme, en présence de KCl 0,2 N, ΔpH est quasi nul pour des concentrations en thiocyanate qui sont capables de provoquer une élévation de pH de 0,5. Ici les ions Cl^- tendent à saturer les emplacements du SCN^- . Les emplacements pour ces deux ions sont identiques d'après Scatchard (119). Ce résultat n'est donc pas surprenant dans le cas de l'ion Cl^- dont la fixation à la sérumalbumine a été montrée et étudiée à plusieurs reprises, il l'est davantage dans le cas d'un ion alcalin dont la fixation est considérée généralement comme nulle.

C. THEORIE DE LA FIXATION SIMULTANEE DE L'ANION ET DE CATION
AVEC INTERACTION ELECTROSTATIQUE MUTUELLE. Cependant en admet-
 tant que cette fixation est très faible sans être nulle on conçoit
 que la fixation d'un anion, en changeant la charge nette de la
 protéine, renforce suffisamment la fixation du cation pour qu'
 elle ne soit plus négligeable.

La charge supplémentaire que peuvent apporter à la protéine
 les ions étudiés est en effet considérable. Le nombre des em-
 placements pour SCN^- et pour Cl^- dépasse 30 (116-117). Les em-
 placements du Ca^{++} sont au nombre de 8 à pH neutre, mais dépas-
 sent 19 à pH alcalin (20) ce qui correspond respectivement à
 16 et à 38 charges élémentaires. Une telle charge supplémen-
 taire peut multiplier l'affinité de l'ion de signe contraire
 par un facteur de 50 à 100.

Un tel système est trop complexe pour qu'on puisse expli-
 citer la fixation de l'un ou l'autre ion. Cependant pour voir
 qualitativement l'effet d'une telle interaction électrosta-
 tique mutuelle de l'anion et du cation fixé sur l'allure des
 courbes $\Delta \text{pH} = f(\text{sel})$ nous avons résolu pour un cas fictif le
 système d'équations suivantes:

$$\left. \begin{aligned} \Delta \text{pH} &= f(\Delta z) = f(r_A, r_C) \\ r_A &= \frac{n_A(A^-)K_A e^{-2w\Delta z}}{1 + (A^-)K_A e^{-2w\Delta z}} \\ r_C &= \frac{n_C(C^+)K_C e^{+2w\Delta z}}{1 + (C^+)K_C e^{+2w\Delta z}} \\ A_{\text{tot}} = C_{\text{tot}} &= (A^-) + r_A(P) = (C^+) + r_C(P) \\ \Delta z &= r_A - r_C \end{aligned} \right\} (12)$$

décrivant la fixation homogène des deux ions du sel A^-C^+ ,
 avec interaction électrostatique mutuelle. Nous avons choisi

un cas où l'anion est fortement fixé $K_A = 10^3$, sur un grand nombre d'emplacements $n_A = 50$

et un cation 100 fois plus faiblement fixé

$K_B = 10$, mais possédant un

nombre égal d'emplacements

$n_B = 50$

w était calculé pour les dimensions de la sérulalbumine:

$$b = 30 \text{ \AA} \quad a = 31,5 \text{ \AA}$$

Le calcul de r_A de r_B et de ΔZ a été fait par approximations successives.

La figure 18 montre les courbes de ΔZ en fonction de la concentration totale d'électrolyte (AC) ajouté à deux solutions de protéine dont la concentration:

$P_1 = 2 \times 10^{-5} M$; $P_2 = 5 \times 10^{-5} M$ est un peu plus basse que celles utilisées dans nos expériences.

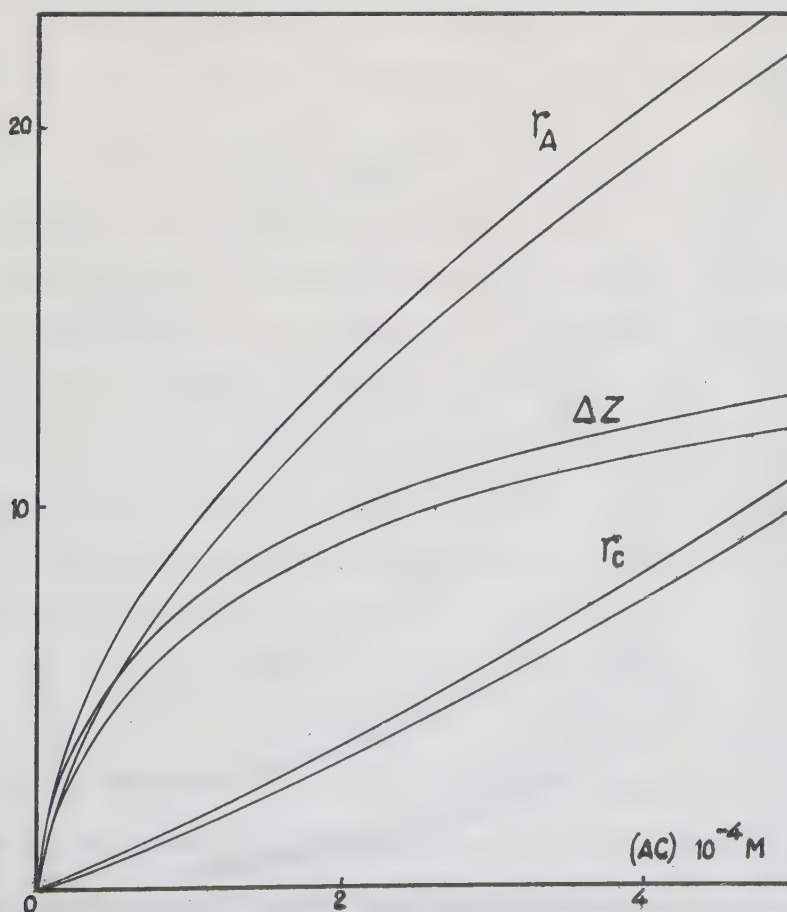


FIGURE 18. Courbes théoriques de fixation simultanée de l'anion A et du cation C en fonction de la concentration de (A C) ajouté, selon le système d'équations (12).

En supposant ΔZ proportionnel à ΔpH ces courbes doivent être comparées à nos courbes expérimentales, fig. 11. Les courbes expérimentales et les courbes théoriques ont bien la même allure et en particulier elles tendent dans les deux cas à devenir parallèles au lieu de se rapprocher l'une de l'autre.

La même figure 18 montre, toujours en fonction de $(AC)_{\text{total}}$ la variation de r_A et de r_C . On voit que r_C négligeable aux faibles concentrations, devient plus important à mesure que Z augmente et tend à devenir parallèle aux variations de r_A . La fixation de l'anion retient sur celle du cation et inversement.

La figure 19 représente $\frac{r}{(A)}$ en fonction de r_A
 a) telle qu'elle résulterait d'une fixation homogène

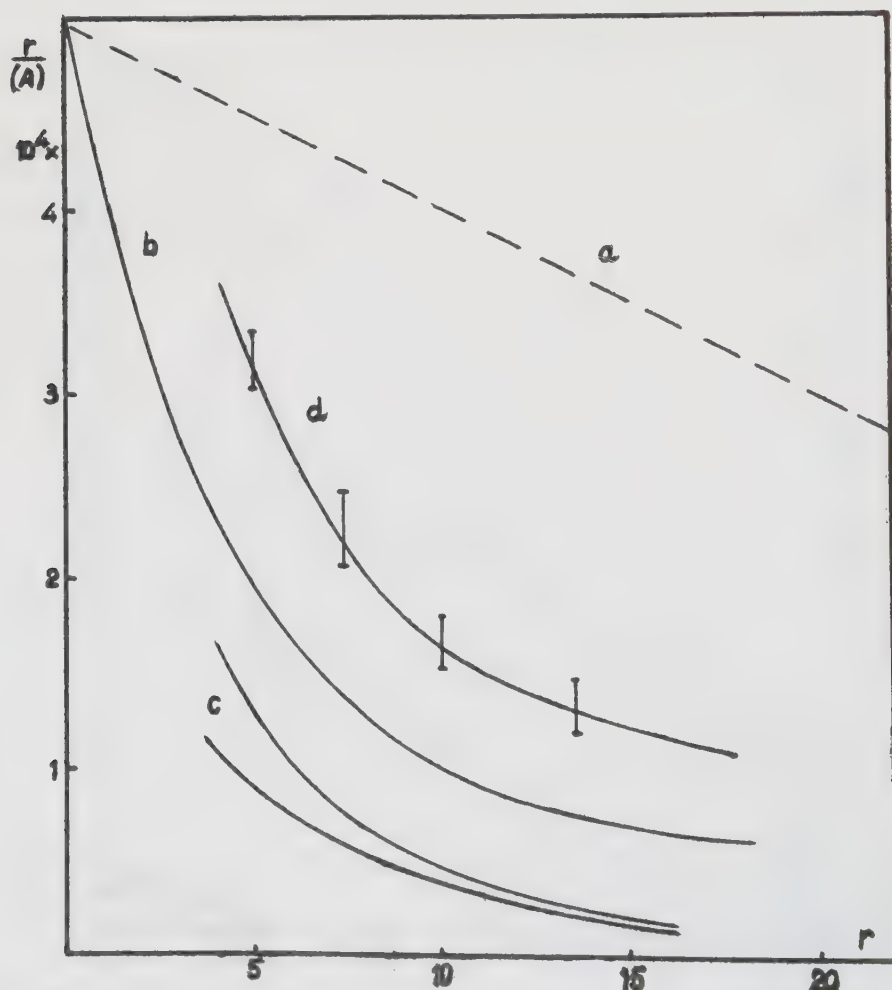


FIGURE 19. $\frac{r}{(A)}$ en fonction de r_A dans le cas fictif décrit dans le texte.

sans interaction électrostatique

$$\frac{r_A}{(A^-)_{\text{libre}}} = K_A n_A - K_A r_A$$

b) telle qu'elle résulte de la théorie d'interaction électrostatique mutuelle. (équations (12))

c) telle qu'elle deviendrait en admettant les simplifications: $r_A = \Delta Z$ et $A_{\text{tot}} = A_{\text{libre}}$ (Scatchard)

d) telle qu'elle résulte de la méthode graphique d'extrapolation à concentration nulle en protéine. (équation (11))

On voit que la courbe théorique b) fait penser à une fixation non homogène, que la saturation semble difficile à atteindre comme ceci s'observe sur un certain nombre de courbes de fixation trouvées dans la littérature (23, 60-63).

Avec les hypothèses de Scatchard, on aboutit à des fixations c) plus faibles que la théorie. L'erreur est plus importante aux basses concentrations de sel et aux fortes concentrations en protéine.

Par la méthode d'extrapolation au contraire on obtient une fixation apparente d) supérieure à celle de la théorie et l'erreur augmente aux fortes concentrations en sel.

Malheureusement la solution du système d'équation en partant des données expérimentales pour trouver les paramètres K_A, K_C, n_A, n_C est si laborieuse et donnerait des résultats si imprécis que nous devons nous contenter d'une analogie qualitative. Il faut souligner cependant que l'hypothèse d'interaction électrostatique mutuelle est plausible et son influence est calculée selon les méthodes généralement employées. Cette hypothèse permet de rendre compte qualitativement des discordances signalées et en outre d'un certain nombre de faits observés.

1) L'inhomogénéité apparente des emplacements dans tous les cas où le nombre d'ions fixés est assez élevé. Voir tableau I p.19.

2) L'absence d'interaction électrostatique constatée (71)

dans tous les cas de fixation d'ions monovalents et la faible interaction dans le cas d'ions bivalents pourrait être expliqué par la fixation simultanée de l'ion du signe opposé.

3) Le fait que la charge nette de la sérumalbumine au cours de la fixation d'ions alkylsulfate tend vers une limite, (83,129) alors que la fixations se poursuit, permet le rapprochement avec la variation de ΔZ dans notre figure 18.

EN CONCLUSION, l'utilisation des données potentiométriques à l'étude de la fixation des ions semble complexe et difficile. L'hypothèse de la fixation simultanée de l'anion et du cation avec interaction électrostatique mutuelle permet de rendre compte de l'allure des phénomènes observés, mais ce fait ne peut pas être considéré comme une preuve de la réalité de cette hypothèse. De plus cette hypothèse est inutilisable pour les calculs numériques. Cependant en admettant que la complexité des résultats expérimentaux est dû principalement à la fixation de l'ion de signe opposé nos calculs pour un cas fictif, démontrent que les deux méthodes simplifiées que nous avons utilisées donnent des erreurs de sens connu et opposé, mais les résultats présentent des variations parallèles l'une de l'autre et probablement parallèles à la réalité.

C'est ainsi qu'en examinant la fixation du Ca en fonction du pH telle qu'elle résulte de la figure 8 p par la méthode de Scatchard et telle qu'elle apparait par la méthode d'extrapolation (figure 40 p.102) on constate des variations parallèles, comportant au moins un maximum et un minimum. Cette concordance nous autorise à tenter une interprétation de ce phénomène dans la 5^{ème} partie de ce travail.

XOXOXOXOX

XOXOX

■

Q U A T R I E M E P A R T I E

RESULTATS DE LA METHODE POLAROGRAPHIQUE

I. ETUDES SUR LA SERUMALBUMINE.

A/ FIXATION DU CADMIUM. La fixation du cadmium sur la sérumalbumine a été étudiée à l'aide de la technique polarographique par Tanford (126).

Cet auteur a démontré qu'il y a une forte fixation du cadmium sur la sérumalbumine à pH neutre, ce qui se traduit par la diminution du courant de diffusion dû à cet ion. Il a vérifié en outre que cette diminution n'était pas due à un effet de viscosité de la solution, ni à l'empêchement de la réduction par un film de protéine adsorbé sur l'électrode à goutte de mercure. Il donne des valeurs de $\bar{x}$ le nombre d'ions fixés par molécule de sérumalbumine pour 4 valeurs du pH initial.

Tanford discute la façon de calculer les constantes d'interaction correspondant à la loi d'action de masse et la précision qu'on peut escompter de tels calculs.

Dans une autre publication il constate (127) que la plus forte fixation du cadmium a lieu dans la zone de pH où les fonctions imidazol sont titrées et que le nombre maximum d'ions fixés tend vers le nombre de ces fonctions présentes dans la molécule de sérumalbumine; et il en déduit que l'emplacement essentiel de la fixation se trouve sur ces fonctions.

Enfin dans une publication consacrée à la formation de complexes entre le cadmium et l'imidazol (130) il affirme retrouver la même constante d'interaction qu'avec la sérumalbumine.

Les calculs de Tanford sont faits sur la base de l'hypothèse que le cadmium libre contribue au courant de diffusion exactement comme en l'absence de protéine et que le cadmium lié y contribue avec un coefficient qui est 0,187 fois celui du cadmium libre. Ce coefficient est déduit de polarogrammes faits avec un gros excès de sérumalbumine à pH 8,7, mais sa valeur n'est pas vérifiée pour d'autres pH. Ce coefficient ne correspond pas au rapport des racines carrées des constantes de diffusion du cadmium et de la sérumalbumine, qui donnerait une valeur voisine de 0,3. C'est ainsi que Stricks et Kolthoff (124) trouvent le courant polarographique du méthylorange lié à la sérumalbumine égal à 30% du courant donné par la même concentration de méthylorange libre.

Dans nos expériences le courant de diffusion polarographique tombe souvent, dans la région alcaline, à une valeur bien plus basse que 0,187 fois celui du cadmium libre. La valeur la plus basse observée a été 0,04.

Il semble donc que tous les ions cadmium fixés ne peuvent pas contribuer au courant polarographique, certains d'entre eux deviennent inaccessibles à la réduction à l'électrode à goutte de mercure. La proportion qui reste accessible est variable avec le pH. De plus, parmi ceux des ions cadmium fixés qui contribuent au courant polarographique, certains atteignent l'électrode sous forme de complexe protéinique, d'autres se dissocient de leur complexe au voisinage de l'électrode. Tanford a montré, en effet, que le courant polarographique du cadmium fixé varie avec le hauteur du réservoir de mercure selon une loi intermédiaire entre celle qui régit le courant contrôlé par la diffusion seule et celle que donnerait un courant contrôlé par la dissociation seule.

Ainsi dans nos calculs nous n'avons pas adopté la méthode de Tanford. Nous avons considéré le cadmium fixé comme polarographiquement inactif. Ceci aboutit pour le calcul de $\underline{r}$ à une discordance constante à un pH déterminé de l'ordre de -18% à -4%. Dans le calcul du cadmium libre la discordance sera variable, d'autant plus importante que la proportion de cadmium fixé sera plus élevé. Dans la zone utile pour l'extrapolation, vers $r = 0$, la discordance sera négligeable. Nous avons préféré courir les risques d'une erreur qui ne dépasse pas les autres erreurs expérimentales pour les points les plus importants à l'extrapolation, plutôt que d'introduire des hypothèses forcément complexes et arbitraires sur la contribution de l'ion fixé au courant polarographique.

Nos expériences s'étendent sur une zone de pH plus large que celles de Tanford et nous devons signaler d'emblée que le nombre d'ions cadmium fixés par molécule de sérumalbumine peut dépasser notablement dans ces conditions 16 le nombre des fonctions imidazol considéré comme une limite par cet auteur.

(1) Comparaison des méthodes polarographique et potentiométrique. La figure 20. représente deux expériences où l'abaissement de pH et la concentration d'ions cadmium libres ont été mesurés simultanément.

La courbe A représente l'abaissement du pH en fonction de la concentration totale de CdCl_2 dans une solution de protéine $0,055 \cdot 10^{-3}$ M.

La courbe C représente la concentration de cadmium mesurée polarographiquement aux pH correspondant à la courbe A.

La courbe B représente l'abaissement du pH d'une solution de protéine ayant le même pH initial, mais une concentration en protéine deux fois plus élevée: $0,110 \cdot 10^{-3}$ M. A côté des points

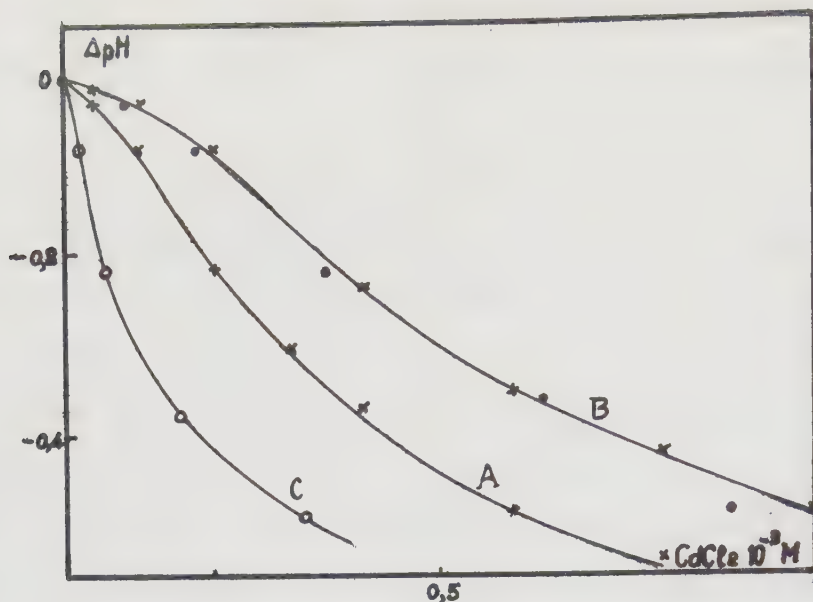


FIGURE 20. Abaissement du pH de la sérualbumine par addition de Cd Cl_2 .

A : $0,55 \cdot 10^{-4}$ Mol sérualbumine

B : $1,1 \cdot 10^{-4}$ Mol sérualbumine

C : Cd^{++} libre mesuré par polarographie dans le mélange A, en fonction de ΔpH

•—• Abaissement du pH dans les conditions B calculé à partir de A et C.

expérimentaux nous avons marqué des points qui résultent du calcul à partir de A et C, avec l'hypothèse que le même abaissement du pH correspond au même nombre d'ions fixés par molécule. La concordance des méthodes potentiométrique et polarographique est satisfaisante. Cependant la sensibilité de ce contrôle n'est pas suffisante pour déterminer une faible contribution du cadmium fixé au courant polarographique, ni pour tester l'incidence sur les déterminations potentiométriques de la différence de force ionique entre les expériences A et B.

2) Fixation du cadmium en fonction du pH. La plupart de nos expériences ont été exécutées de la manière suivante : une quantité déterminée de sérualbumine est mise en contact

d'une solution de chlorure de cadmium dans la cellule polarographique. Après désaération, le courant de diffusion est mesuré. On additionne ensuite des quantités successives de soude, on homogénéise le mélange par barbotage d'hydrogène, et on mesure le courant de diffusion après chaque addition. Le pH atteint à chaque point est mesuré dans la cellule du polarographe au cours même de l'expérience. La force ionique initiale est en général 5 à 10 fois supérieure à celle qui serait due au sel de cadmium seul, grâce à l'addition de KCl 0,01 M.

La figure 21 représente une série de courbes faites avec la même concentration en sérumalbumine et des quantités variables de chlorure de cadmium. En abscisses sont portés les nombres d'équivalents de soude ajoutés, $\bar{h}$ par molécule de sérumalbumine; en ordonnées le nombre d'ions cadmium fixés par molécule, $\underline{r}$, calculé par différence, entre le courant de diffusion mesurée et celui correspondant à la concentration initiale en cadmium.

Il résulte de l'examen de ces courbes : Que la fixation, quasi nulle au point isoionique, débute lentement par addition de soude dans la région tamponnée par les groupements carboxyl.

Elle augmente rapidement quand $\bar{h}$ passe de -8 à -12, bien avant le palier de la courbe de titrage. Cependant il est probable qu'il s'agit de la fixation du cadmium sur les groupements qui se dissocient vers pH 7,8 et dont le pK apparent est très abaissé en présence de cadmium (Figure 15, page 57).

Ensuite on observe un plateau plus ou moins horizontal entre $\bar{h} = -20$ et $\bar{h} = -24$, où il n'y a pas de fixation supplémentaire de cadmium, malgré une augmentation de la charge nette de la protéine.

Enfin un segment ascendant marque une nouvelle fixation

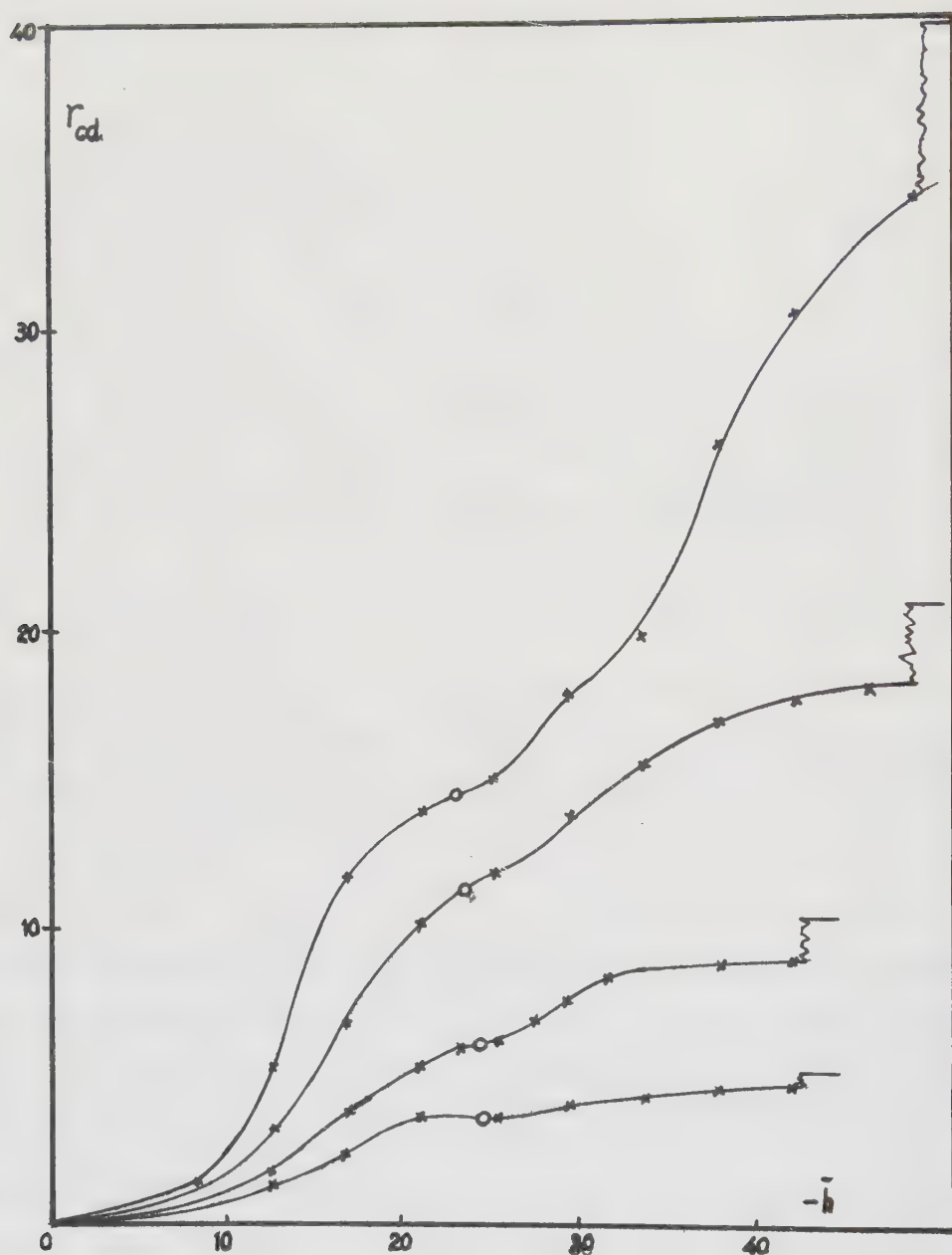


FIGURE 21.

Nombre d'ions fixés sur la sérualbumine en fonction du nombre d'équivalents de NaOH ajoutés.

Sérualbumine partout $0,51 \times 10^{-3} M$.

$CdCl_2$ ajouté $0,25, 0,5, 1,0$ et $2,0 \times 10^{-3} M$.

Les lignes brisées montrent le rapport Cd total (P) total.

du cadmium d'autant plus importante qu'il reste davantage d'ions libres disponibles à la fin du palier précédent. Très probablement cette fixation se fait sur les fonctions amine de la sérumine, bien que là encore le pH est très au-dessous du pK de ces fonctions.

Il est intéressant de remarquer que la pente de ces courbes, $-dr/dE$ peut dépasser 1/2 et même 1, l'addition d'un équivalent de NaOH permet alors la fixation de plus d'un ion Cd^{++} .

Les domaines de fixation sur les deux groupes d'emplacements sont suffisamment séparés, pour qu'on puisse déterminer le nombre maximum d'ions cadmium fixés sur le premier groupe, au niveau du plateau.

Si on porte ce nombre en fonction de la concentration totale de cadmium ajouté, on obtient la courbe A, figure 22, qui montre nettement la tendance à la saturation de ce premier groupe d'emplacements.

Par contre, si on porte sur le même graphique le nombre total de Cd fixé en fin de titrage ($\bar{h} = -42$, pH final env. 9,2) on obtient la courbe B, figure 22. Cette courbe ne montre aucune tendance à la saturation alors que 34 ions Cd sont fixés par molécule.

Considérons la courbe A comme étant l'isotherme de la fixation du cadmium sur une série d'emplacements de la sérumalbumine, quoique les points représentatifs ne correspondent rigoureusement ni au même pH ni à la même force ionique. En adoptant la représentation (4')

$$\frac{r}{(Cd^{++})} = f(r)$$

nous obtenons les points de la figure 23, qui sont compatibles avec une fonction linéaire. L'extrapolation donne:

$$n = 17 \text{ environ}$$

$$\sum K_j = 68.10^3$$

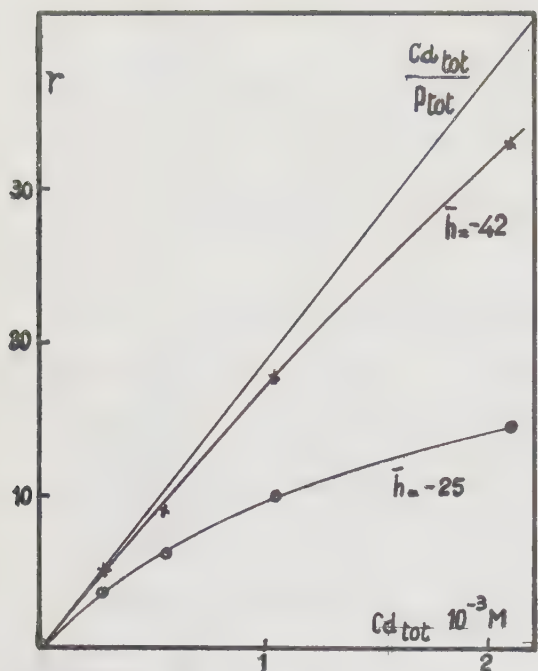


FIGURE 22. Nombre d'ions Cd fixés en fonction de la concentration totale en cadmium. O—O sur le palier; x—x en fin de titrage. — Cd total disponible.

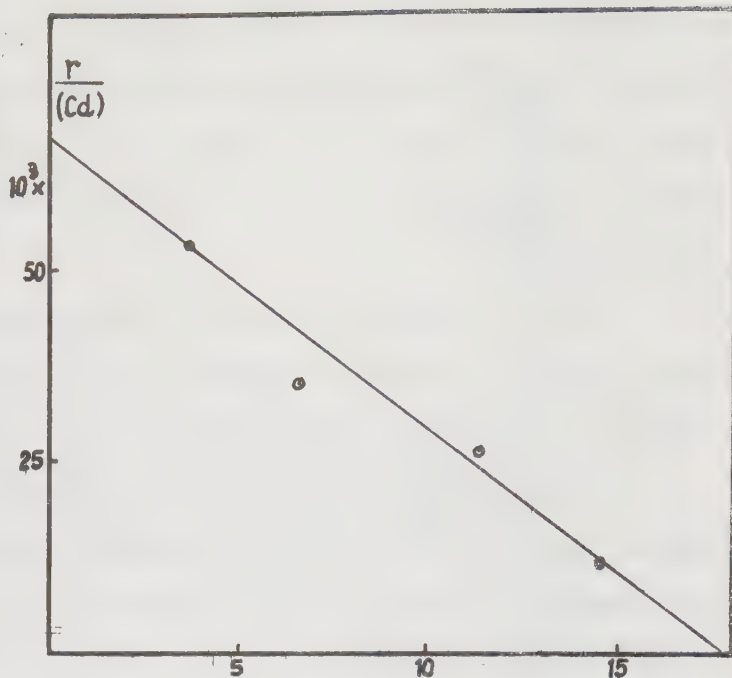


FIGURE 23. Représentation de la fixation du Cd, selon l'équation (4') pour $\bar{h} = 25$.

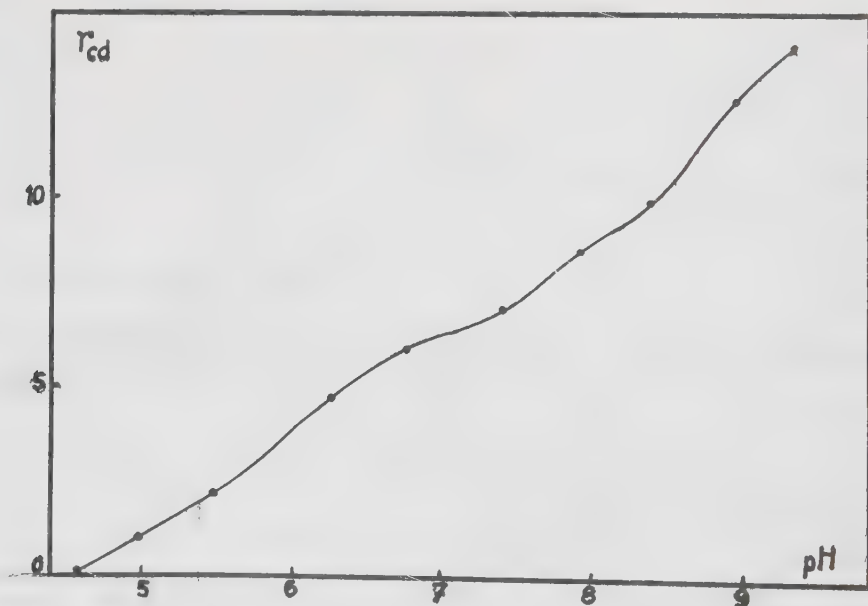


FIGURE 24. Fixation du Cd sur la sérumalbumine en fonction du pH. Cd Cl₂ ajouté $1,0 \cdot 10^{-3}$ M.

en supposant toutes les constantes intrinsèques identiques

$$K = \frac{68 \times 10^3}{17} = 4,0 \times 10^3$$

Cependant, les données de la figure sont insuffisantes pour affirmer l'uniformité des constantes successives et l'absence d'interaction électrostatique des ions Cd successivement fixés.

La figure 24 représente une courbe analogue aux précédentes (Fig. 19) mais r est représenté comme fonction du pH réel atteint à chaque point expérimental.

Sur cette courbe on peut faire les mêmes remarques que sur la figure 19 : il n'y a aucun segment que l'on puisse considérer comme linéaire, mais la courbe se partage là encore en deux portions distinctes séparées par un palier qui s'étend de pH 6,8 à 7,4 environ. Donc la fixation sur la première série d'emplacements supposée être les groupements imidazol est terminée à pH 7, alors qu'en absence de Cd ces fonctions sont titrées de 7,6 à 8,2 à la concentration en KCl 0,01 à laquelle a été faite cette expérience.

B. FIXATION DU BLEU DE METHYLENE SUR LA SERUMALBUMINE .

Le bleu de méthylène est un cation bivalent et il était intéressant de comparer sa fixation avec celle des ions minéraux. Les expériences de Klotz ont montré que d'une façon générale les cations organiques étaient fixés dans une mesure beaucoup plus faible que les anions de configuration semblable.

Les expériences avec le bleu de méthylène ont été faites⁽⁸⁵⁾ suivant le même schéma que celles avec le cadmium.

Le colorant a été ajouté à l'albumine isoionique et par addition progressive de soude le pH a été amené jusqu'à 9,8. Après chaque addition de NaOH le pH et le courant de diffusion dûs au bleu de méthylène ont été mesurés.

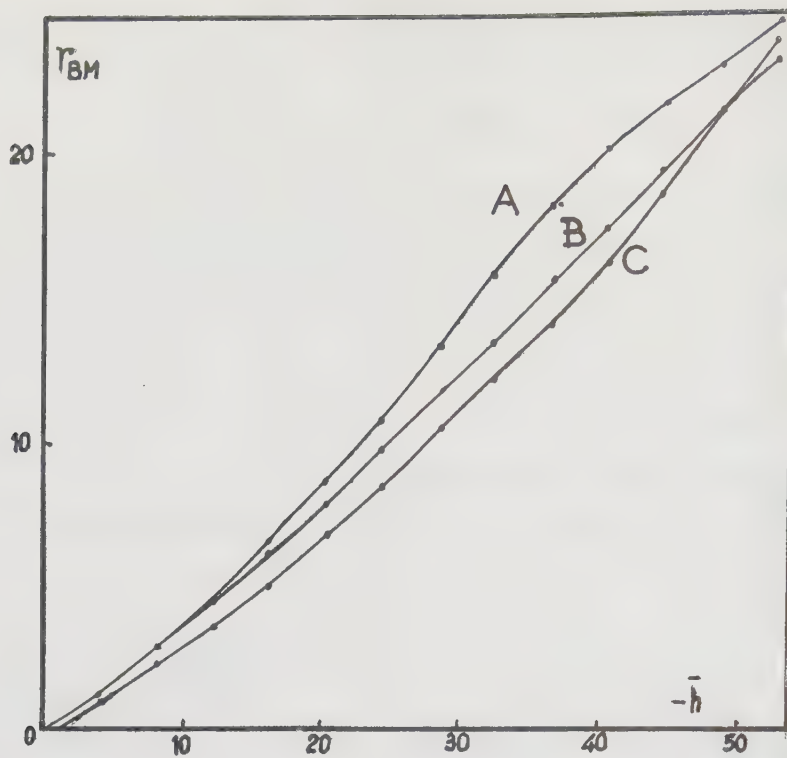


FIGURE 25. Fixation de bleu de méthylène sur la sérumalbumine en fonction du nombre d'équivalents de soude ajouté.
 A : KCl 0,02 N B : KCl 0,01 N + CaCl_2 0,0033 M.
 C : CaCl_2 0,0066 M.

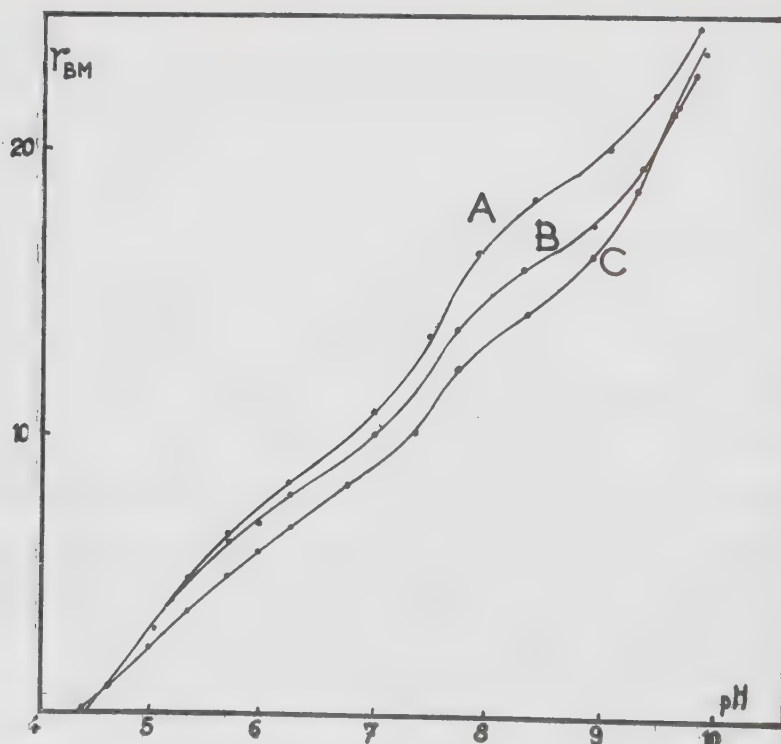


FIGURE 26. Même expérience. r représenté en fonction du pH.

Les figures 25 et 26 représentent les résultats d'une telle expérience. Sur la figure 25 le nombre de molécules de bleu de méthylène liées par molécule de sérumalbumine r est représenté en fonction du nombre d'équivalents de NaOH ajoutés, tandis que sur la figure 26 r est représenté en fonction du pH mesuré.

En fin d'expérience près de la moitié du bleu de méthylène initial, $2,34 \cdot 10^{-3}$ Mol/litre, est encore à l'état libre ce qui illustre bien l'affinité plus faible de la sérumalbumine pour ce cation organique par comparaison à son affinité pour le cadmium.

On conçoit en effet qu'un tel cation organique se fixe sur la protéine par attraction électrostatique et par des forces de Van der Waals mais il ne peut pas former des complexes par coordinance avec les fonctions amine comme le cadmium.

Cependant on voit qu'à pH = 7 cette protéine a lié 10 molécules de colorant et qu'à pH 9,8 elle en a fixé 24 molécules, ce qui illustre le grand nombre d'emplacements disponibles.

La fig. 26 représente une étroite analogie avec une courbe de titrage ayant un palier (tendant ici vers la verticale) à pH 7,75, ce qui correspond à peu près au palier de l'imidazol à la force ionique $\mu = 0,02$. Cette analogie apparaît encore sur la figure 25. La courbe presque linéaire montre que l'addition de deux molécules de NaOH entraîne la fixation d'environ une molécule de bleu de méthylène. Avec des concentrations initiales plus faibles de bleu de méthylène on observe des courbes analogues mais de pente plus faible. Sur ces courbes il est difficile de distinguer des groupes d'emplacements plus ou moins homogènes. La courbe de titrage potentiométrique est très peu affectée par la fixation du bleu de méthylène.

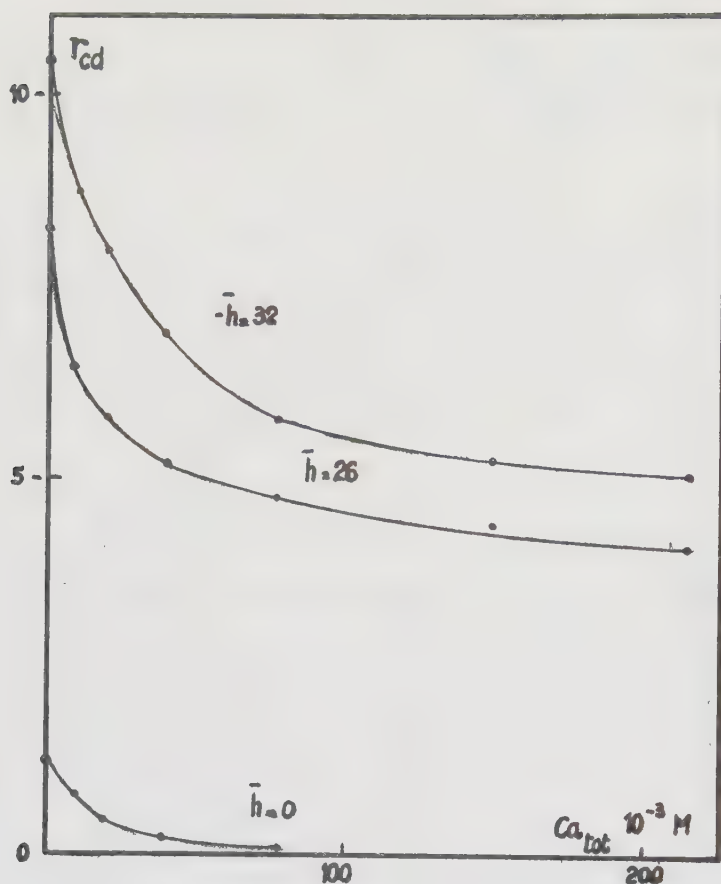


FIGURE 27. Nombre d'ions Cd fixés sur la sérulalbumine, en fonction de CaCl_2 ajouté.

C. COMPETITION DANS LA FIXATION DE DIVERS CATIONS.

1) Compétition Ca - Cd. La figure 27 représente le nombre d'ions Cd fixés à trois pH initiaux différents en fonction de la concentration de CaCl_2 ajouté. Ici on observe une libération d'ion Cd au cours de l'expérience (ce qui démontre la réversibilité de la fixation).

Au pH isoionique la fixation de Cd est très faible, elle devient nulle dès que la concentration en CaCl_2 atteint 0,08 M.

Pour 26 équivalents de NaOH ajoutés par molécule de protéine la fixation du Cd est plus forte et la compétition du Ca^{++} reste très sensible ainsi que pour $\bar{h} = -32$. Ces deux points se trouvent de part et d'autre du palier qui sépare les deux domaines de fixation du Cd.

Dans ces deux dernières expériences la concentration de cadmium libre n'a pas varié de plus de 5% le long de l'expérience, la libération d'ion Cd a été à peu près compensée par la diffusion due au CaCl_2 ajouté. Dans ces conditions on peut tenter de définir un coefficient de compétition Ca-Cd.

Supposons en effet que tous les emplacements disponibles pour le cadmium et pour le calcium soient communs, au nombre de n et homogènes pour chacun de ces deux ions.

La fixation de ces ions pris séparément obéira aux équations:

$$r_{\text{Cd}}^0 = \frac{n K_{\text{Cd}} (\text{Cd}^{++})}{1 + K_{\text{Cd}} (\text{Cd}^{++})}$$

$$r_{\text{Ca}}^0 = \frac{n K_{\text{Ca}} (\text{Ca}^{++})}{1 + K_{\text{Ca}} (\text{Ca}^{++})}$$

Quand les deux espèces d'ions sont présentes simultanément:

$$r_{\text{Cd}} = \frac{(n - r_{\text{Ca}}) K_{\text{Cd}} (\text{Cd}^{++})}{1 + K_{\text{Cd}} (\text{Cd}^{++})}$$

$$r_{\text{Ca}} = \frac{(n - r_{\text{Cd}}) K_{\text{Ca}} (\text{Ca}^{++})}{1 + K_{\text{Ca}} (\text{Ca}^{++})}$$

d'où

$$r_{\text{Cd}} = \frac{n K_{\text{Cd}} (\text{Cd}^{++})}{1 + K_{\text{Cd}} (\text{Cd}^{++}) + K_{\text{Ca}} (\text{Ca}^{++})}$$

et enfin

$$\frac{r_{\text{Ca}}}{r_{\text{Ca}}^0 - r_{\text{Ca}}} = \frac{1}{(\text{Ca}^{++})} \left[\frac{1}{K_{\text{Ca}}} + \frac{K_{\text{Cd}}}{K_{\text{Ca}}} (\text{Cd}^{++}) \right]$$

ainsi, en portant $r/(r^0 - r)$ en fonction de $(1)/(\text{Ca}^{++})$, on doit obtenir une droite passant par l'origine et ayant une pente

$$\frac{1}{K_{\text{Ca}}} + \frac{K_{\text{Cd}}}{K_{\text{Ca}}} (\text{Cd}^{++}) \approx \text{constante.}$$

La figure 28 est construite selon cette représentation à partir des données des courbes de la figure 27. On voit que la représentation rectiligne n'est pas valable pour les fortes concentrations de Ca (près de l'origine) et que les lignes des tracées par les points correspondants aux faibles concentrations en Ca ne passent pas par l'origine. On peut en conclure que le Ca n'entre pas en compétition avec le Cd pour tous les emplacements de celui-ci avec la même affinité relative, et peut-être même pas du tout pour un certain nombre d'entre eux. Ce traitement néglige en effet l'action répulsive électrostatique que les ions Ca fixés à des emplacements indépendants peuvent exercer sur les ions Cd.

La tendance des points expérimentaux à s'incurver vers l'origine permet de supposer une compétition moins efficace dans cette région.

2) Compétition Ca - Bleu de méthylène. Les figures 25 et 26 (page 79) représentent trois expériences polarographiques avec de bleu de méthylène, où r est porté en fonction du pH (26) ou en fonction de h (25). Les trois expériences ont été faites à la même force ionique 0,02, la courbe A: en présence de KCl 0,02N B: KCl 0,01N + CaCl_2 0,0033 M C: CaCl_2 0,0067 M. On voit que là encore la compétition du calcium est surtout sensible aux pH supérieurs au palier de l'imidazole.

3) Compétition Cd - Bleu de méthylène. Dans les expériences de compétition avec ces deux cations la concentration de chacun des ions libres peut être suivie par polarographie. La figure 29 représente le nombre d'ions Cd fixés quand le Cd est seul et quand il est en présence de bleu de méthylène: la figure 30 représente le nombre d'ions bleu de méthylène fixés en l'absence ou en présence de cadmium.

On voit que la fixation du Cd est peu modifiée par la pré-

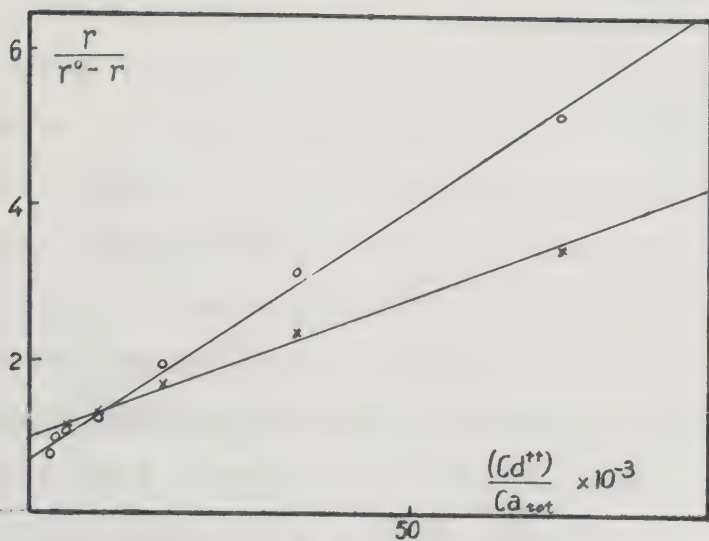


FIGURE 28. Compétition du calcium avec le cadmium.

Données de la figure 27 ○ pour $\bar{h} = -26$, x pour $\bar{h} = -32$.

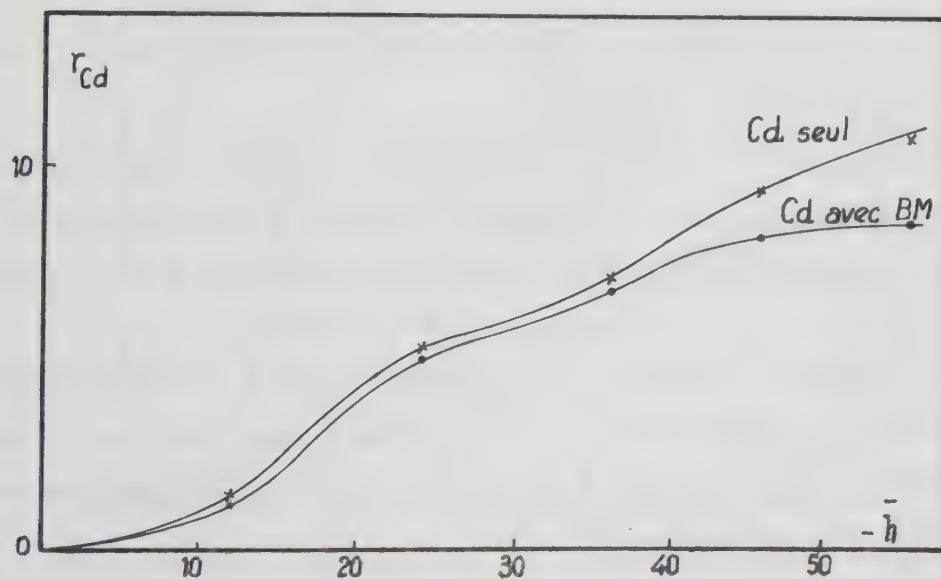


FIGURE 29. Compétition du bleu de méthylène avec le cadmium. Sérumaalbumine $0,38 \cdot 10^{-4}$ M; Cd Cl_2 $0,5 \cdot 10^{-3}$ M; BM $1,26 \cdot 10^{-3}$ M.

sence du bleu de méthylène sauf dans la région alcaline.

Par contre, la fixation de bleu de méthylène est fortement inhibée en présence de Cd, c'est seulement dans la région alcaline que l'on voit la courbe se redresser, montrant la plus forte affinité du bleu de méthylène dans cette région.

Ces expériences montrent que le rapport des affinités des emplacements pour ces deux cations bivalents varie avec le pH, donc les deux affinités n'évoluent pas parallèlement en fonction du pH. On peut en conclure que les emplacements sont ou bien différents, ou bien, s'ils sont communs, leur affinité pour les deux ions dépend de détails de structure distincts.

II. ETUDES SUR LA β -LACTOGLOBULINE.

FIXATION DU CADMIUM.

Avec la β -lactoglobuline nous avons fait deux séries d'expériences, la première à concentration totale de Cd constante et à pH variable, la seconde à concentration de Cd variable partant de divers pH initiaux.

La figure 31 représente deux courbes de fixation du Cd en fonction de la quantité de soude ajoutée à une solution isotonique de lactoglobuline en solution de KCl 0,2 N. La première A contient 1×10^{-3} M CdCl_2 , la seconde B $0,5 \times 10^{-3}$ M.

La fixation augmente lentement jusqu'à 12 équivalents de NaOH puis plus rapidement. La réaction est rapide, l'équilibre est atteint en moins de 2 minutes, jusqu'à 24 équivalents de NaOH ajoutés. Au-delà, la réaction devient plus lente et les zones hachurées représentent l'évolution des mesures observée pendant 10 minutes après chaque addition. A l'extrémité supérieure de la courbe B le courant de diffusion est inférieur à 10% de sa valeur initiale et ne semble pas tendre vers une limite. Nous avons donc admis comme pour la sérumalbumine que le cadmium fixé contribue de façon négligeable au courant polarographique.

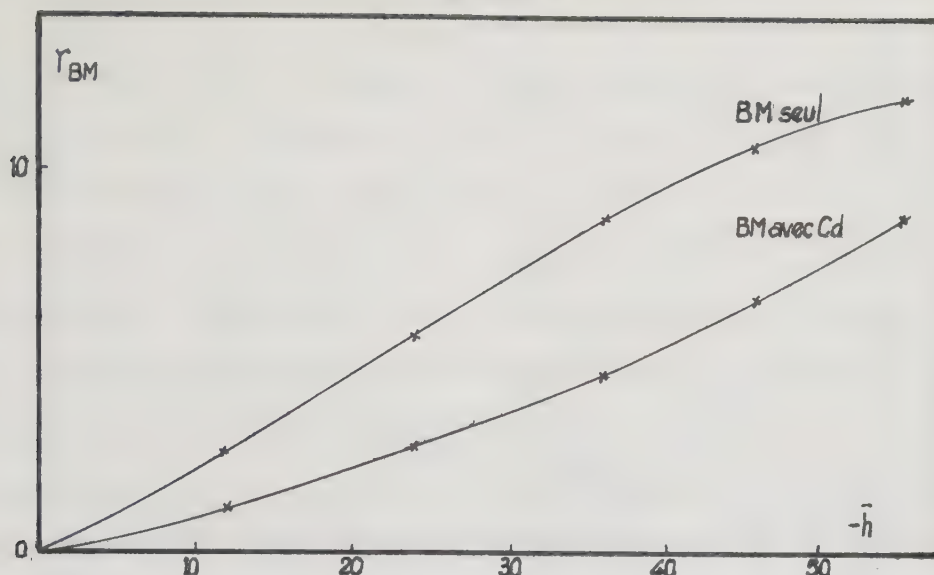


FIGURE 30. Compétition du cadmium avec le bleu de méthylène. Même expérience que la figure 29.

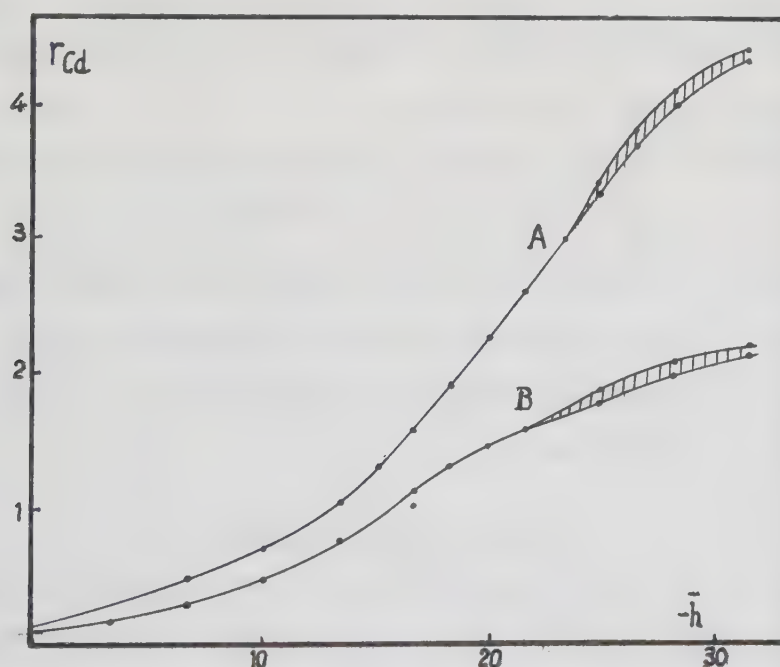


FIGURE 31. Fixation du Cd sur la lactoglobuline en solution $0,19 \cdot 10^{-3}$ M. en fonction de $\bar{h}$. Cadmium A: $1,0 \cdot 10^{-3}$ M. B: $0,5 \cdot 10^{-3}$ M. = $0,2$ (K Cl).

Sur ces courbes on observe une ébauche de palier à $h = -22$ qui rappelle celui observé dans le cas de la sérumalbumine; mais beaucoup moins marqué. Comme ce palier précède de très peu la zone où la réaction devient lente et où les mesures perdent de leur pré-

cision, il est difficile d'affirmer avec certitude son existence.

La figure 32 représente le résultat de 5 expériences effectuées à $\bar{h}$ constante et à (Cd^{++}) variable, comme nombre d'ions Cd fixés $\underline{r}$ en fonction du logarithme de la concentration libre: $r_{cd} = f [\log (Cd^{++})]$. Ce sont des "courbes de formation" du complexe, souvent employées dans la littérature. Les courbes A, B, C, D et E, faites respectivement aux valeurs de: $\bar{h}=0, \bar{h}=-7,95; -11,9, -15,9, -19,8$ sont à peu près superposables par translation le long de l'axe de $\log(Cd^{++})$. Il est donc probable que dans toute cette zone les emplacements sont les mêmes. De plus une représentation de $\frac{r}{(Cd^{++})}$ en fonction de $\underline{r}$ (figure 33) donne une ligne droite dans le domaine, où $\underline{r}$ varie de 0,4 à 4. Ce fait est en accord avec l'hypothèse d'une série homogène d'emplacements sans interaction électrostatique. L'extrapolation donnerait un nombre d'emplacements $n = 7,8$.

Par contre la courbe F, figure 32 diffère sensiblement des quatre précédentes. Elle est faite dans la zone alcaline, $\bar{h} = -23,9$ où la réaction de fixation n'est plus instantanée. Cette courbe fait apparaître deux emplacements de forte affinité qui se distinguent nettement des autres emplacements. La fixation est inhomogène.

III. CONCLUSIONS.

La méthode polarographique est particulièrement adaptée à l'étude des fixations d'ions sur les protéines. Elle nous a permis l'étude approfondie de la fixation du cadmium et de la fixation du bleu de méthylène sur la sérumalbumine et celle du cadmium sur la lactoglobuline en fonction du pH.

Dans la fixation du Cd sur la sérumalbumine on distingue nettement deux domaines de pH: dans le premier, allant du point isoionique jusqu'à pH 7 environ, les fonctions imidazol seules fixent le Cd, à pH plus alcalin de nouveaux ions Cd sont fixés proba-

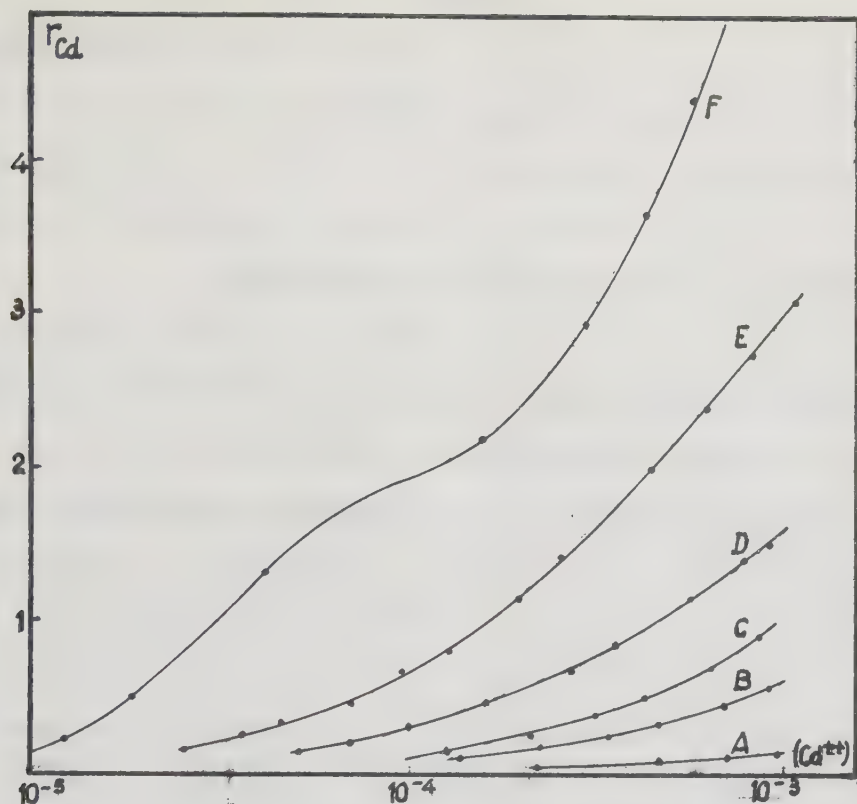


FIGURE 32. Courbes de formation du complexe Lactoglobuline-cadmium.

A: $\bar{h}=0$, B: $\bar{h}=-7,95$, C: $\bar{h}=-11,9$, D: $\bar{h}=-15,9$, E: $\bar{h}=-19,8$,
F: $\bar{h}=-23,8$. Partout $\mu=0,2$ (KCl).

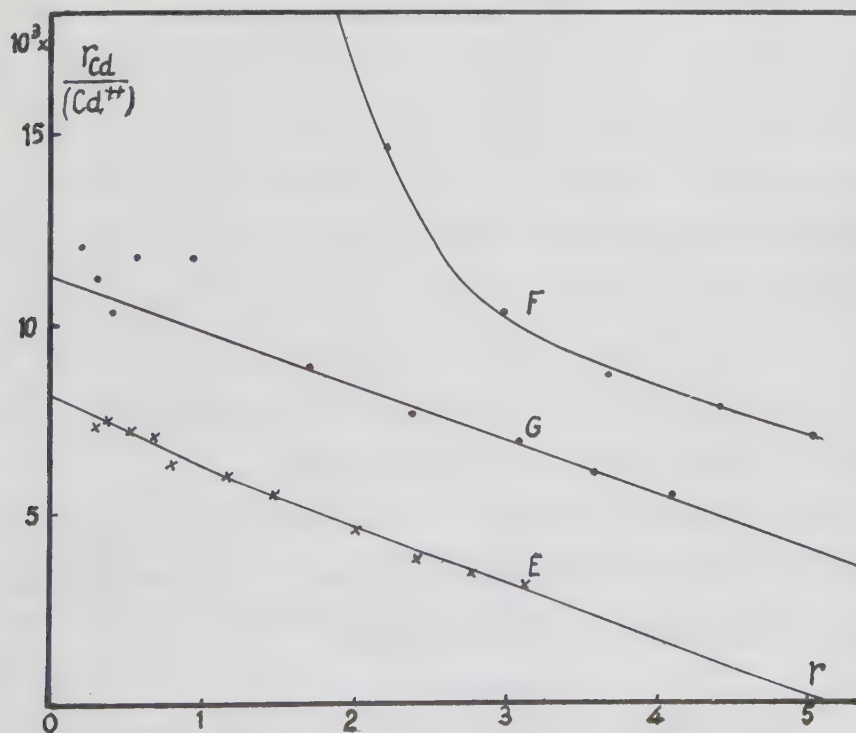


FIGURE 33. Fixation du cadmium sur la lactoglobuline, représentée selon l'équation (4'). E et F comme sur la figure 32; G: $h=-21,8$ $\mu=0,1$.

blement sur les fonctions amine. Mais alors que la fixation sur les fonctions imidazol s'approche de la saturation à pH 7 pour une concentration en cadmium de 2×10^{-3} M. les emplacements disponibles à pH plus élevé ne tendent pas vers la saturation dans le domaine de concentration explorée.

La fixation du bleu de méthylène est très différente de celle du cadmium. Le nombre des emplacements est élevé mais leur affinité pour l'ion est faible. Il n'y a aucune discontinuité dans la variation de cette affinité avec le pH. Ces variations semblent être dues uniquement aux variations de l'attraction électrostatique.

La fixation du cadmium inhibe fortement celle du bleu de méthylène, inhibition que l'on peut attribuer en majeure partie à la modification de la charge nette de la protéine. Ce n'est qu'à pH élevé que le bleu de méthylène montre une compétition notable vis-à-vis du Cd. Dans cette zone, la dissociation des fonctions amine favorise sans doute la fixation du bleu de méthylène par forces de Van der Waals.

La compétition du calcium avec le cadmium ne suit pas une loi simple basée sur l'identité des emplacements de fixation de ces deux ions. On sait en effet (20) qu'à pH neutre la sérumalbumine ne possède que 8 emplacements pour Ca contre 17 pour Cd.

La fixation du cadmium sur la lactoglobuline à pH neutre semble se faire selon la loi des emplacements homogènes sans interactions électrostatiques comme on observe souvent en présence de fortes concentrations d'un sel "indifférent" (ici KCl 0,2N). Par contre à pH alcalin la fixation est nettement inhomogène avec deux emplacements de forte affinité.

Ces résultats nécessitent une analyse plus approfondie pour interpréter les variations en fonction du pH en termes de modifications structurales de la protéine.

C I N Q U I E M E P A R T I E

ESSAI D'INTERPRETATION DE LA FIXATION DES IONS SUR LES PROTEINES EN FONCTION du pH.

I. ACTION SIMULTANEE du pH PAR PLUSIEURS MECANISMES.

A/ MECANISME ELECTROSTATIQUE. Nous avons montré dans la première partie que seule l'action électrostatique de la charge de la protéine était certainement commune à tous les emplacements de fixation qu'ils soient homogènes ou hétérogènes Il faut donc commencer par tenir compte de ce mécanisme pour pouvoir ensuite étudier les deux autres mécanismes qui peuvent agir différemment sur les divers emplacements.

Or, pour pouvoir tenir compte de la charge nette de la protéine il faut exécuter les expériences en l'absence de tampon (II9). Cette méthode seule est capable de maintenir constante le nombre $\bar{h}$ d'ions H^+ fixés par molécule de protéine. En présence de tampon l'abaissement du pH qui serait provoqué par la fixation de cations est compensé par une dissociation à "pression constante" d'ions H^+ qui sont captés par l'anion du tampon. Au contraire la fixation d'un anion sera compensé par la recombinaison d'ions H^+ fournis par le tampon. De toute façon la charge nette de la protéine variera de façon incontrôlée. De plus, le tampon introduit dans le système des anions et des cations qui peuvent entrer en compétition avec les ions dont on étudie la fixation.

Dans une expérience exécutée à $\bar{h}$ constante on peut tenir

compte de l'interaction électrostatique par la formule

$$K_j = K_j^0 e^{-2wZ'}$$

et on peut calculer des constantes d'association intrinsèques

$$K_j^0 = K_j e^{2wZ'} \quad \text{et} \quad \sum K_j^0 = \sum K_j e^{-2wZ'}$$

Etant donné les incertitudes sur la valeur de w que nous avons soulignées dans la discussion de la 3e partie, il est préférable d'en déterminer la valeur graphiquement en représentant les résultats de l'expérience comme

$$\log K_{app} = \log(\sum K_j) = f(\bar{h}) \quad (13)$$

Si l'interaction électrostatique est la seule qui fait varier K_{app} cette représentation doit donner une ligne droite de pente $-2wZ' \times 2,303$ d'où on peut déduire la valeur expérimentale de w .

Si les emplacements contiennent une ou plusieurs fonctions ionisables dont l'état d'ionisation influe sur la fixation on doit choisir sur la courbe 13 un segment suffisamment éloigné des pK en cause, et prendre la pente de ce segment égale à $-2wZ' \times 2,303$.

B/ Si la dissociation d'un ion H^+ de l'emplacement est indispensable à la fixation, ou, au contraire, l'exclut de façon absolue, la courbe de $\log K_j^0 = f(pH)$ doit correspondre à celles décrites par Dixon, c'est-à-dire comporter des segments rectilignes de pentes 0, +1, -1, etc...

Mais dans le cas général des fixations multiples la seule constante obtenue par extrapolation est

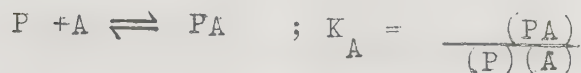
$$\sum K_j = \lim_{r \rightarrow 0} \frac{r}{(A)}$$

La représentation logarithmique de Dixon ne reste valable que si tous les K_j varient dans le même sens et si tous dépendent de fonctions dissociables ayant le même pK .

Quand ce n'est pas le cas, il faut passer à une représen-

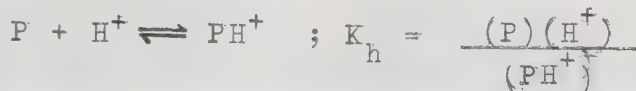
tation arithmétique donc additive.

Les équations pour le cas de compétition de l'ion H^+ avec l'ion étudié A s'écriront:



$$K_{app} = \frac{(PA)}{(P)+(PH^+)(A)} = \frac{(P)(A)K_A}{(P)(A)\left[1 + \frac{(H^+)}{K_h}\right]} = \frac{K_A}{1 + \frac{(H^+)}{K_h}} \quad (14)$$

Dans le cas inverse où l'association de H^+ est indispensable à la fixation:



$$K_{app} = \frac{(PH^+A)}{(P)+(PH^+)(A)} = \frac{(PH^+)(A)K_A}{(PH^+)(A)\left[\frac{K_h}{(H^+)} + 1\right]} = \frac{K_A}{\frac{K_h}{(H^+)} + 1} \quad (15)$$

Dans l'un et l'autre cas K_{app} en fonction de pH donne une courbe en S, descendante dans le premier cas, ascendante dans le second.

Pour l'ensemble des emplacements, la représentation arithmétique:

$$\sum K_{app} = \frac{\left[\lim_{x \rightarrow 0} \frac{x}{(A)} \right]_{x=0}}{e^{-2whz_A}} = f(pH) \quad (16)$$

devra donner la somme de plusieurs courbes sigmoïdes. Si les emplacements sont homogènes et chacun ne dépend que d'un seul ion H^+ de même pK les courbes sigmoïdes élémentaires sont superposables et leur somme donnera une seule courbe sigmoïde dont une branche tendra asymptotiquement vers zéro. Si au contraire certains emplacements sont indépendants de la dissociation d'une fonction donnée, alors que d'autres en dépendent, on obtiendra

dans la zone du pK la superposition d'une droite horizontale avec une courbe en S, et la branche descendante de la courbe sigmoïde ne tendra pas vers zéro.

C) Si l'emplacement change de structure par la dissociation d'un ion H^+ mais de telle sorte qu'il peut fixer A aussi bien à l'état non dissocié qu'à l'état dissocié; avec des affinités différentes, on aboutit aux équations:

$$\begin{aligned}
 P + H^+ &\rightleftharpoons PH^+ ; & K_h &= \frac{(P)(H^+)}{(PH^+)} \\
 P + A &\rightleftharpoons PA ; & K_{A1} &= \frac{(PA)}{(P)(A)} \\
 PH^+ + A &\rightleftharpoons PH^+A ; & K_{A2} &= \frac{(PH^+A)}{(PH^+)(A)} \\
 K_{app} &= \frac{(PA) + (PH^+A)}{[(P) + (PH^+)](A)} = \frac{(P) \left[K_{A1}(A) + K_{A2}(A) \frac{(H^+)}{K_h} \right]}{(P)(A) \left[1 + \frac{(H^+)}{K_h} \right]} = \\
 &= \frac{K_{A1} + K_{A2} \frac{(H^+)}{K_h}}{1 + \frac{(H^+)}{K_h}}
 \end{aligned}$$

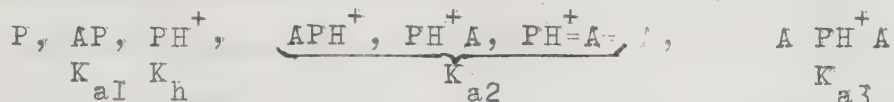
enfin:

$$K_{app} = \frac{K_{A1} - K_{A2}}{1 + \frac{(H^+)}{K_h}} + K_{A2} \quad (17)$$

Exprimé sous cette dernière forme on voit que la fonction $K_{app} = f(pH)$ a deux composants, dont l'un a la même forme sigmoïde que les courbes traitées dans le paragraphe précédent: (14), (15) l'autre étant constant. La courbe sigmoïde sera ascendante ou descendante selon le signe de $(K_{A1} - K_{A2})$ mais sa branche descendante ne tend pas vers zéro. On conçoit qu'une telle courbe peut être le résultat d'une fixation par deux points, où l'un des points de fixation dépend de l'état de dissociation d'une fonction ionisable.

Sur deux points de fixation on peut éventuellement fixer soit une, soit deux molécules A, les deux étant fixées cha-

cune par un seul point. Dans ce cas on peut symboliser les espèces existantes de la façon suivante :



et la constante d'association apparente sera :

$$K_{app} = \frac{K_{A1} + \frac{(H^+)}{K_h} \cdot K_{A2} + 2(A)K_{A3}}{1 + \frac{(H^+)}{K_h}} \quad (18)$$

quand (A) tend vers zéro le terme en $2(A)K_{a3}$ devient négligeable et on retrouve une équation de même forme que ci-dessus. (14) (15) et (17)

Il faut souligner ici que le sens des variations due à l'effet de structure ne peut pas être prédit sur la base de la nature anionique, cationique ou neutre de A. En effet l'apparition d'un point d'attache électrostatique doit augmenter l'affinité d'un cation avec le pH et diminuer celle d'un anion, par contre un point d'attache par force de van der Waals peut apparaître par la regression de l'ionisation, quelle que soit la nature de A, et cette régression peut être l'effet des variations du pH en sens inverse pour des centres anioniques et pour des centres cationiques de la protéine. De même un pont hydrogène peut être conditionné ou rompu par la dissociation d'un ion H^+ (94) rendant ainsi inaccessible ou accessible un point d'attache.

En résumé une courbe déduite de l'expérience

$$\sum K_j = \frac{\left[\lim_{r \rightarrow 0} \frac{r}{(A)} \right]}{e^{-2whz}} = f(pH) \quad (16)$$

peut être rectiligne, horizontal ou composé de segments horizontaux séparés par des courbes en S ascendantes ou descendantes dont les points d'inflexion doivent être situés au niveau des pK caractéristiques des fonctions ionisables présentes dans les emplacements. Seul le cas d'une droite horizontal ou d'une seule courbe en S dont la branche descendante tend vers zéro permettent d'affirmer que tous les emplacements sont de même nature comportant la même fonction ionisable. Dans le cas d'une ou plusieurs courbes en S qui ne tendent pas vers zéro les emplacements peuvent être homogènes ou hétérogènes.

II. APPLICATIONS.

A/ FIXATION DU METHYLORANGE SUR LA SERUMALBUMINE DE BOEUF.

Nous essayerons tout d'abord l'application de cette méthode sur les résultats de Karush (61) concernant la fixation du méthylorange sur la sérumalbumine de boeuf. Ces résultats sont obtenus par la méthode de partage entre deux solvants non miscibles et exprimés par l'auteur selon la méthode d'extrapolation proposé par lui :

$$\sum K_j = \lim_{r \rightarrow 0} \frac{r}{o(A)}$$

La figure 34 résume ces résultats en fonction du pH. On voit que les variations de la constante d'interaction sont très difficiles à interpréter sous cette forme.

La figure 35 représente les mêmes données, mais représentées comme $\log \sum K_j = f(\tilde{h})$.

La ligne droite en pointillé sur cette figure représente l'effet de la seule interaction électrostatique par rapport à un état standard situé entre les pK de l'imidazol et ceux des amines. (L'état standard situé entre les carboxyl et les imidazol comporte trop peu de points pour y définir une pente.) De

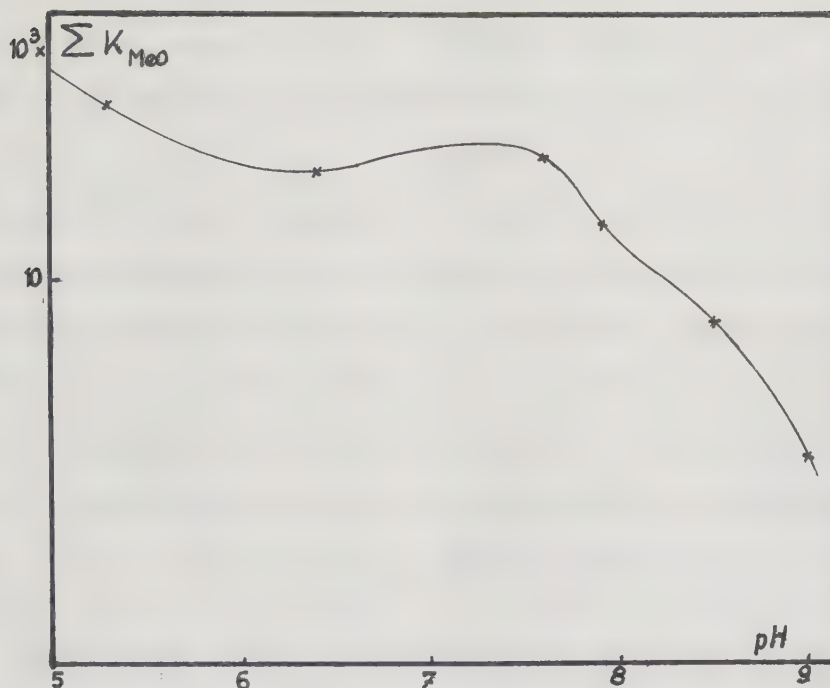


FIGURE 34. Constantes d'interaction du méthylorange, avec la sérumalbumine en fonction du pH selon Karush (60).

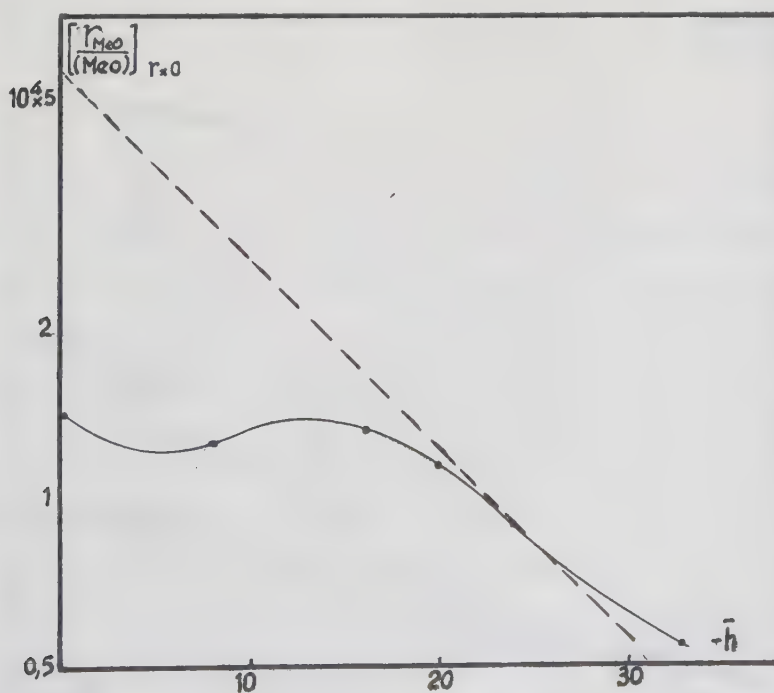


FIGURE 35. Les mêmes constantes en ordonnées logarithmiques, en fonction de la charge nette de la protéine.

cette pente on peut déterminer la valeur de w

$$w = 0,0500$$

La valeur théorique calculée par Karush pour ce cas est

$$W = 0,0619$$

Nous avons signalé dans la première partie les raisons pour lesquelles cette valeur théorique est incertaine et les justifications du choix empirique d'une valeur inférieure.

La troisième étape de la vérification de la théorie consiste à représenter les valeurs des constantes d'interaction, après déduction de l'interaction électrostatique, en fonction du pH. selon l'équation (16).

La figure 36 montre le résultat de cette représentation avec trois valeurs de w ; 0,0400, 0,0500, et 0,0619. Les trois courbes ont la même allure: une partie approximativement horizontale de pH 5,3 à 7 env., une courbe en S ayant son point

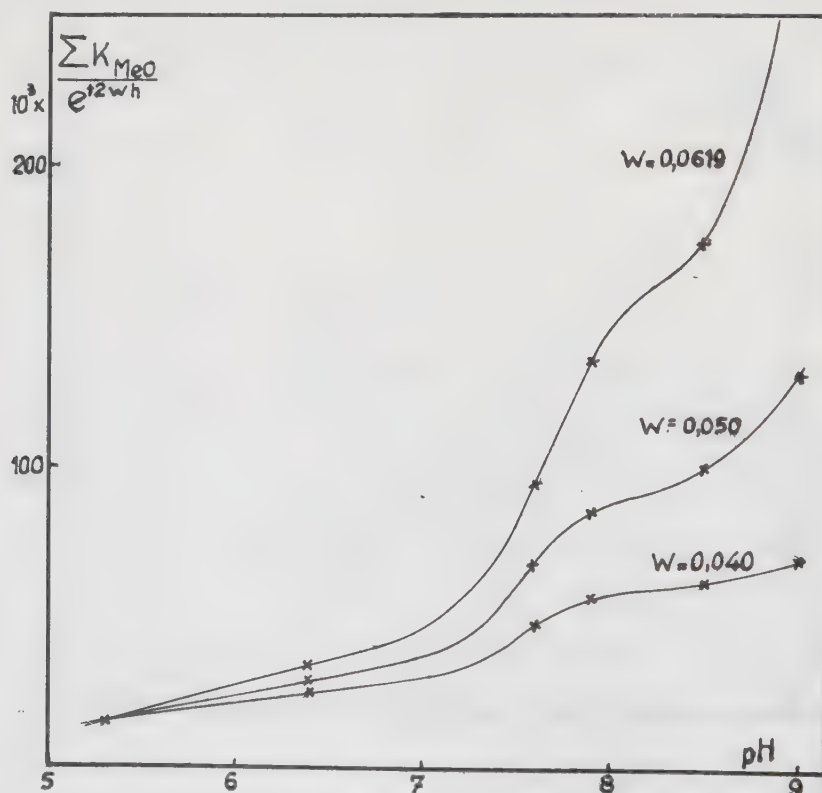


FIGURE 36. Fixation de méthylorange sur la sérumalbumine.; Constantes d'association après déduction de l'interaction électrostatique, en fonction du pH.

d'inflexion à 7,6 environ suivie d'un palier qui n'est pas rigoureusement horizontal et enfin une remontée vers pH 9 qui pourrait être le début d'un deuxième segment en S.

La première courbe en S correspond assez bien avec le pK des fonctions imidazol déduit de nos courbes de titrage à la force ionique de ces expériences $\mu = 0,1$. La nouvelle remontée à pH 9 pourrait passer par un point d'inflexion vers 9,2 ce qui tendrait à identifier le pK des fonctions amine de la lysine. Il est probable que cette remontée s'accroît beaucoup à pH plus élevé; étant donné que Klotz (85) a trouvé à pH 9,2 une interaction du méthylorange, supérieure à celle constatée à pH neutre.

Ainsi on pourrait décrire la fixation du méthylorange sur la sérumalbumine à l'aide d'un petit nombre de points d'attraction cationiques, 22 d'après Klotz (71) et une stabilisation du complexe par des forces de van der Waals. Ce deuxième point d'attache devient plus favorable quand les fonctions imidazol perdent leur charge, et se renforce encore quand une partie des fonctions amine de la lysine commencent à se dissocier. A pH 9 - 9,2 le nombre de ces fonctions dissociées est assez faible pour respecter les 22 emplacements électrostatiques et se crée probablement un nombre plus grand d'emplacements où le méthylorange peut se fixer par les seules forces de van der Waals. Selon cette description il faudrait admettre qu'à pH plus élevé encore les points d'attraction électrostatiques disparaissent entraînant une certaine baisse de l'affinité mais la persistance de nombreux emplacements non ioniques maintient une affinité non négligeable.

B. FIXATION DU CADMIUM SUR LA SERUMALBUMINE. La figure 3/ ne présente une récapitulation de nos expériences polarographi-

ques sur la fixation du cadmium représentée comme

$$\frac{r_{cd}}{(Cd^{++})} = f(r_{cd})$$

Les diverses courbes correspondent à diverses charges initiales de la protéine allant de $\bar{h} = -12$ à $\bar{h} = -41$.

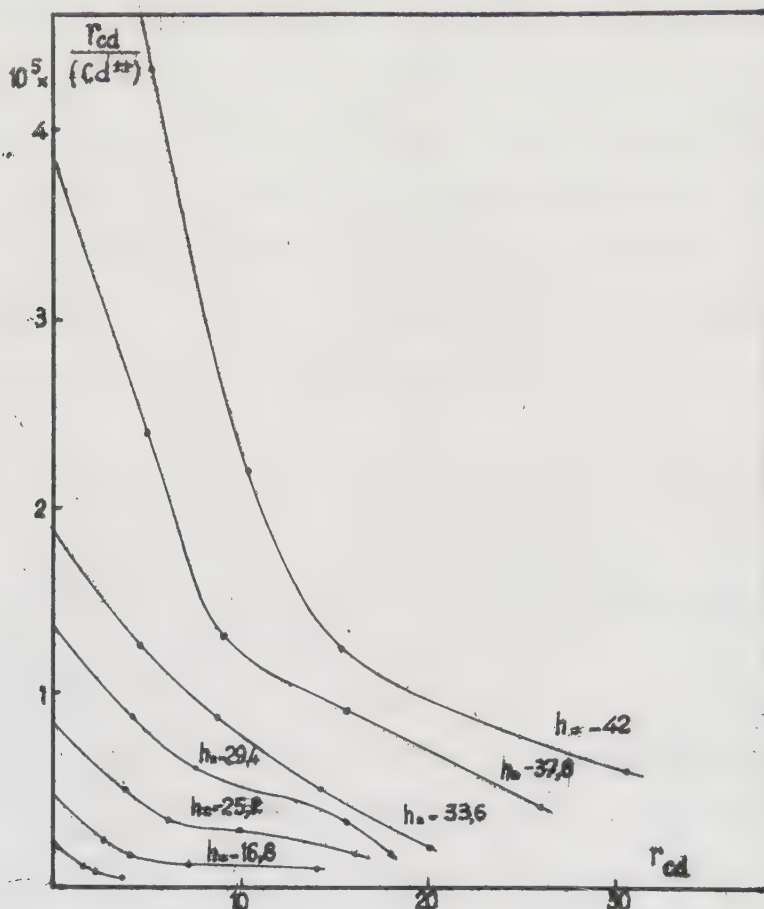


FIGURE 37. Extrapolation de $\frac{r_{cd}}{(Cd^{++})} = f(r_{cd})$

L'extrapolation de ces courbes vers $r = 0$ donne les valeurs de $\sum K_{cd}$ qui sont portées en fonction de $-\bar{h}$ sur la courbe semi-logarithmique de la figure 38. Comme sur la figure 35 nous avons représentée une droite qui correspondrait à la variation de l'interaction sous le seul effet de l'attraction électrostatique à partir d'un état standard situé entre les pK des carboxyl et des imidazol.

De la pente de cette droite on déduit une valeur de

$$w = 0,0400$$

là encore inférieure à la valeur théorique qui serait ici de

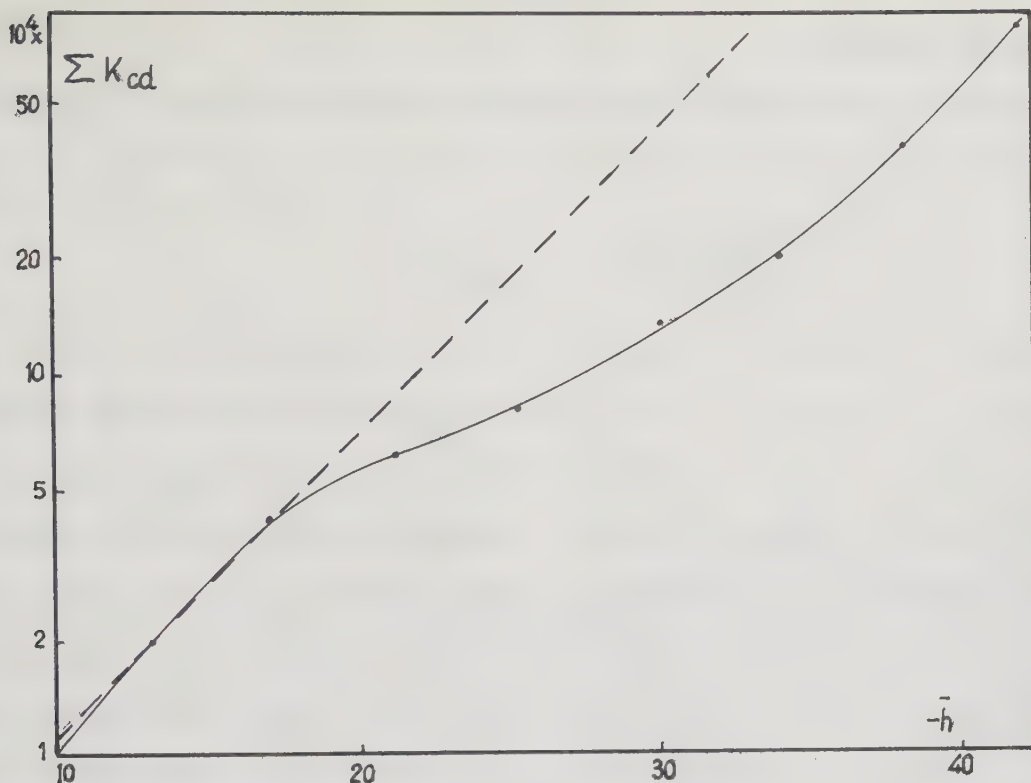


FIGURE 38. K_{cd} en ordonnées logarithmiques en fonction de la charge de la sérualbumine.

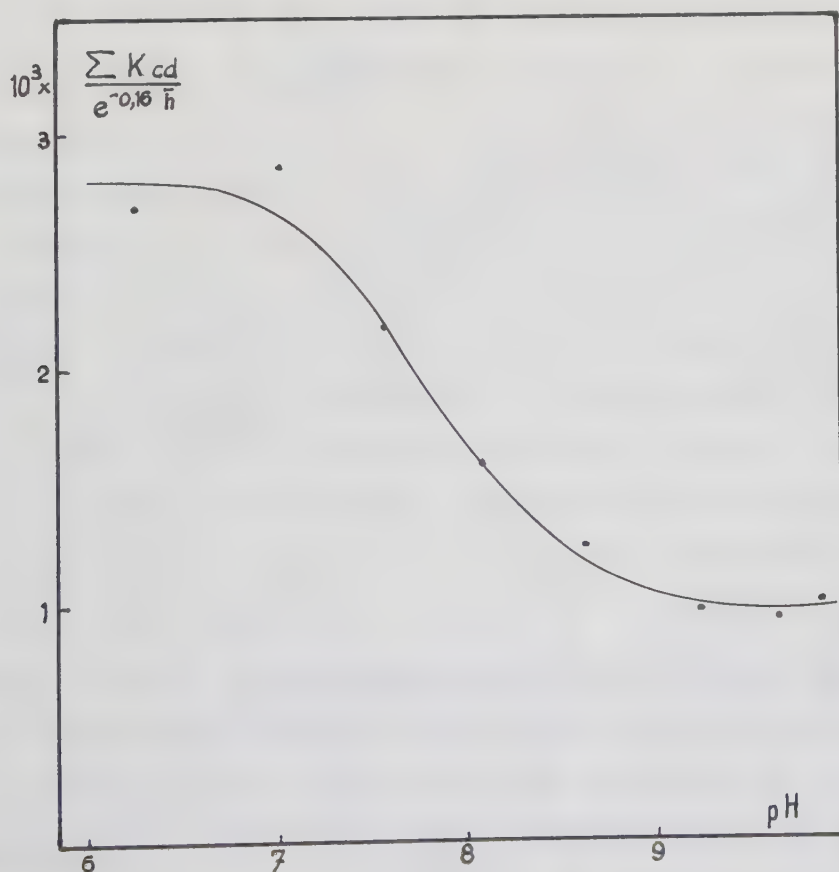


FIGURE 39. Constantes d'association Cd- sérualbumine, après déduction de l'interaction électrostatique, en fonction du pH.

l'ordre de 0,0700.

Enfin, troisième étape, la figure 39 représente la courbe

$$\frac{\left[\lim_{r \rightarrow 0} \frac{r}{(\text{Cd}^{++})} \right]}{e^{-2whz'}} = f(\text{pH})$$

qui montre un segment en S avec un point d'inflexion à pH 7,7. L'allure descendante de cette courbe est surprenante. En effet la fixation du cadmium se fait d'après Tanford sur les fonctions imidazol et le nombre des emplacements à pH neutre, 17 dans nos expériences, concorde bien avec cette vue. On devait s'attendre à ce que la dissociation de H^+ de l'imidazol facilite la fixation du cadmium par diminution de la compétition de l'ion H. Mais un travail récent de Li et al (96), concernant la fixation du cadmium sur l'imidazol et sur le 1-méthylimidazol a montré que la fixation se fait sur l'azote imine du noyau et non sur l'azote 1 porteur d'un hydrogène dissociable.

Une autre confirmation de la forme de la courbe de fixation du Cd sur la sérumalbumine peut être trouvée dans l'étude des courbes publiées par Tanford. Sur les 5 courbes exécutées à des valeurs variables du pH on ne peut pas déduire facilement $\sum K_{\text{cd}}$, mais on peut trouver facilement des nombres qui lui sont proportionnels en calculant $\frac{r_{\text{cd}}}{(\text{Cd}^{++})}$ pour $r = 3$, par exemple. Les valeurs ainsi calculées en fonction de $\bar{h}$ ont une allure semblable à notre courbe figure 38, en particulier entre $\bar{h} = -20$ et $\bar{h} = -30$, l'augmentation d'affinité est très inférieure à celle prévue par la seule interaction électrostatique.

C.FIXATION DU CALCIUM SUR LA SERUMALBUMINE. Dans le cas de la fixation du calcium nos résultats expérimentaux sont beaucoup moins précis que dans le cas de cadmium. En particulier l'extrapolation des valeurs de $\frac{r_{\text{Ca}}}{(\text{Ca}^{++})}$ vers $r = 0$ est impossible.

Pour tirer partie de ces résultats nous avons choisi les valeurs les mieux connues correspondant dans nos calculs à $r_{Ca} = 5$, mais en réalité à une valeur plus faible de la fixation. On peut considérer que les valeurs de

$$\left[\frac{r_{Ca}}{(Ca^{++})} \right]_{r=5}$$

subissent des variations de même sens et à peu près proportionnelles à celles de $\left[\frac{r_{Ca}}{(Ca^{++})} \right]_{r=0}$

La figure 40 représente la variation de ces valeurs en fonction de h sur une échelle semi-logarithmique. La droite représente la variation des constantes d'interaction sous le seul effet de l'attraction électrostatique en partant d'un état standard situé entre les pK des carboxyl et des imidazol. On en déduit pour w la valeur de 0,0380 très voisine de celle choisie pour le cadmium.

Enfin, la figure 41 représente

$$\frac{\left[\frac{r_{Ca}}{(Ca^{++})} \right]_{r=5}}{e^{-2whz_a}} = f(pH)$$

On y remarque une courbe en S descendante dont le point d'inflexion se trouve à pH 7,7 environ. La concordance avec le pK déduit de la courbe du cadmium est excellente.

La branche descendante de cette courbe atteint des valeurs très faibles, ce qui peut s'expliquer par le fait que ces valeurs n'ont pas été extrapolées vers $r = 0$.

Dans ce cas, comme dans le cas du cadmium l'allure descendante de la courbe en S est difficile à expliquer.

L'hypothèse la plus vraisemblable consiste à admettre que la dissociation des fonctions imidazol favorise l'établissement de certains ponts hydrogène entre cette fonction et un donateur de H comme par exemple les fonctions oxhydriyl ou phénol, et l'existence de ces ponts hydrogène défavorise la fixation des métaux.

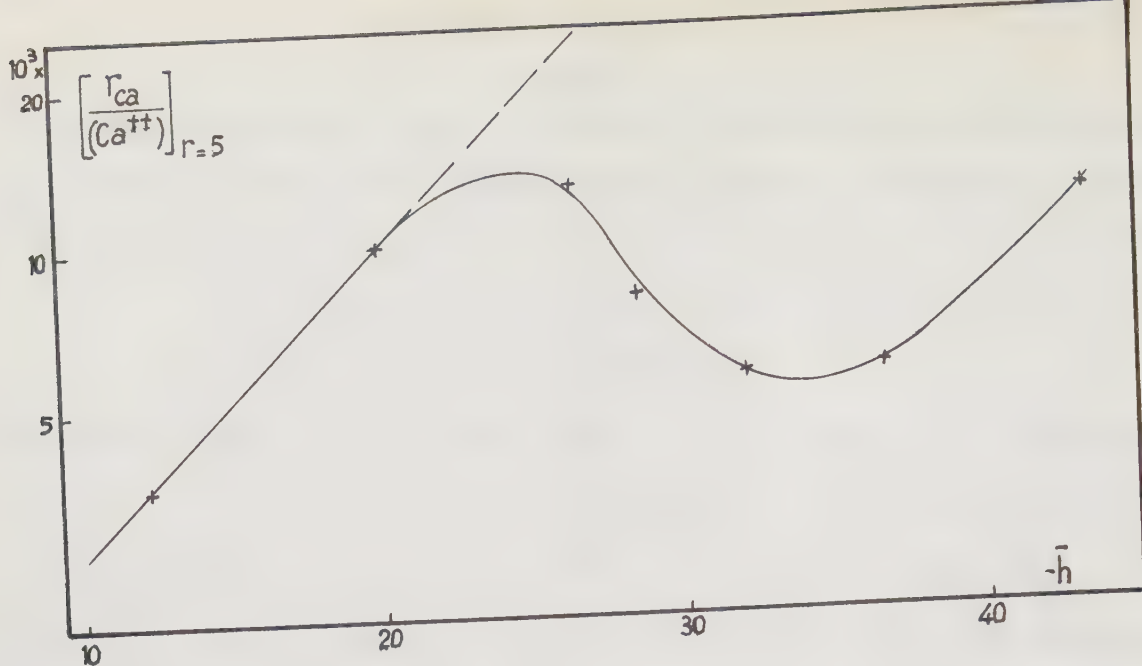


FIGURE 40. $\left[\frac{r_{Ca}}{(Ca^{++})} \right]_{r=5}$ en ordonnées logarithmiques en fonction de la charge de la sérumaalbumine.

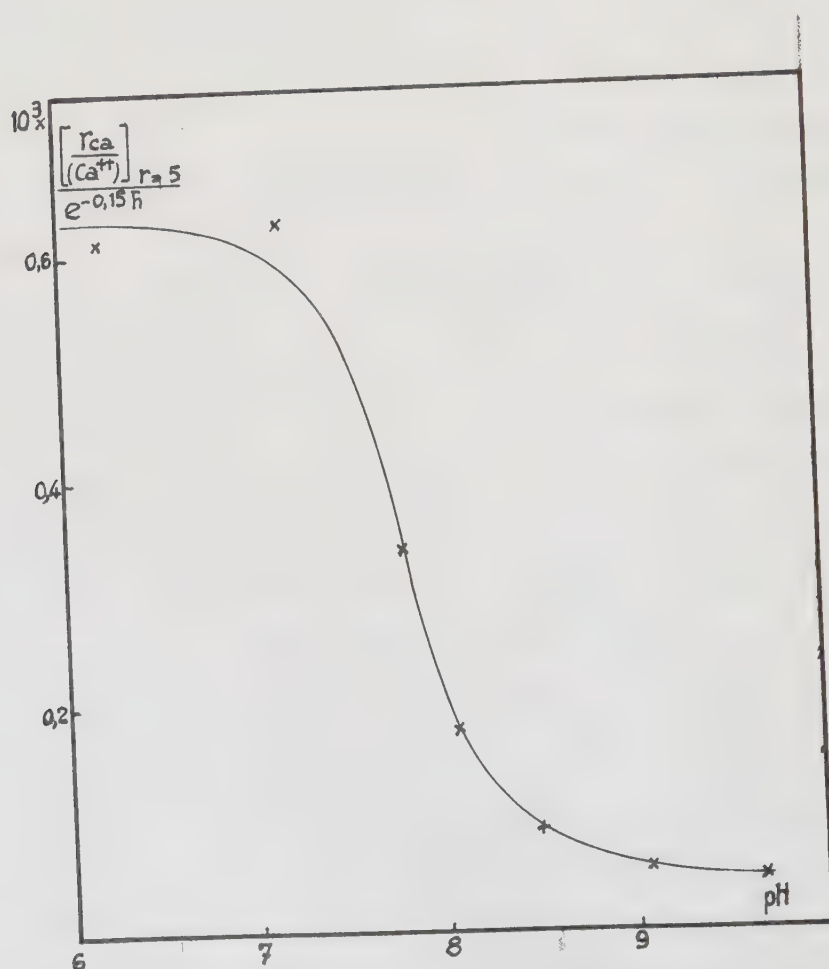


FIGURE 41. Les mêmes données après déduction de l'interaction électrostatique, en fonction du pH.

D. FIXATION DU CADMIUM SUR LA β -LACTOGLOBULINE. Dans le cas de la β -lactoglobuline nous avons porté sur la figure 42 les valeurs de $\log \frac{r_{cd}}{(Cd^{++})}$ en fonction de $\bar{h}$ pour trois valeurs de r_{cd} ; $r_{cd} = 0$ par extrapolation, $r_{cd} = 1$ et $r_{cd} = 3$. Les courbes correspondant à $r = 0$ et $r = 1$ sont pratiquement parallèles. Les deux présentent un segment rectiligne allant de $\bar{h} = 0$ à $\bar{h} = -19$, suivie d'une remontée importante à $\bar{h} = -23,8$ où le pH initial est 9,3. Cette remontée correspond à l'apparition des deux emplacements de forte affinité visibles sur la courbe de formation figure 32. La courbe correspondant à $r_{cd} = 3$ ne comporte que deux points, mais la pente définie par ces deux points n'est pas aussi élevée que celle des deux autres courbes dans la même région. Ces points ne sont pas affectés par l'existence de ces deux emplacements privilégiés à pH 9,3.

La pente déduite de la partie rectiligne donne à w la valeur de 0,0470. Cette valeur a servi au calcul de:

$$\frac{\sum K_i}{e^{-2whz_u}}$$

qui est représenté figure 43, en fonction du pH initial. Sur cette figure on voit que la somme des constantes d'interaction intrinsèques reste invariable de pH 5,2 à pH 8,1 environ, pour monter brusquement à pH = 9,3. Le pK auquel correspond cette apparition de nouveaux emplacements est difficile à déterminer, mais il semble correspondre à une fonction amine.

Quelle est d'autre part la nature des emplacements existant à pH neutre ? On sait que la β -lactoglobuline ne possède que quatre restes histidyl dont deux sont masqués à l'état natif vis-à-vis du réactif de Sanger (112).

Le nombre des emplacements pour le Cd semble être de 8 à pH 8,5 et à $\mu = 0,1$, et six seulement à pH 8,2 $\mu = 0,2$.

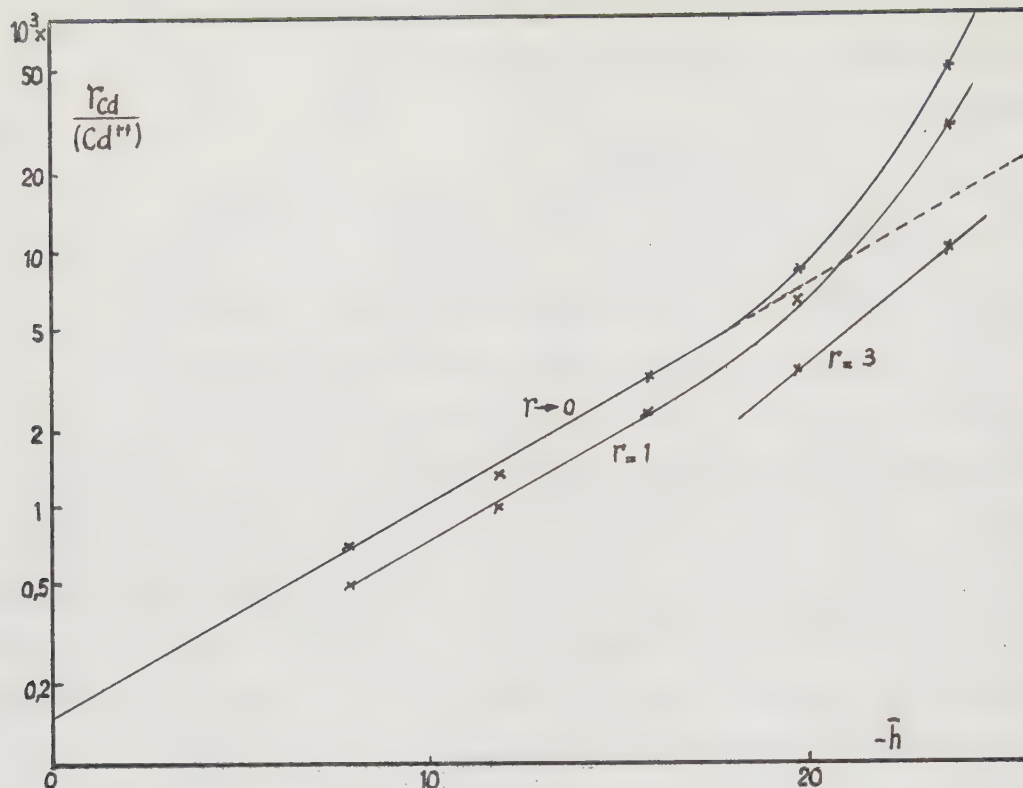


FIGURE 42. Constantes d'interaction cadmium - lactoglobuline en ordonnées logarithmiques, en fonction de la charge nette.

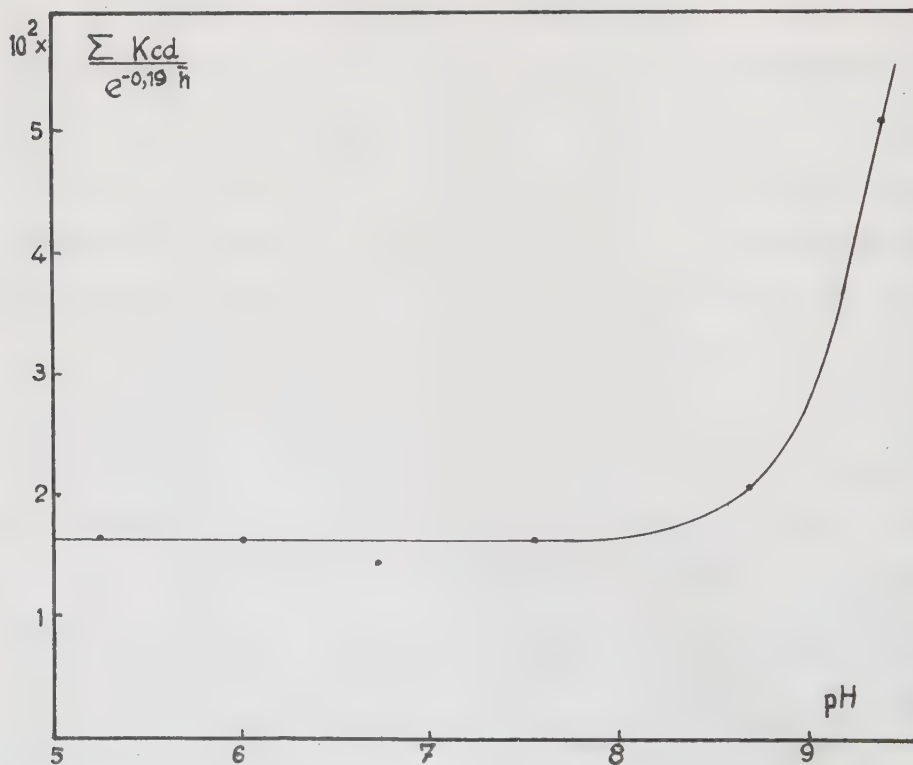


FIGURE 43. Constantes d'association cadmium-lactoglobuline après déduction de l'interaction électrostatique, en fonction du pH.

Ces extrapolations doivent d'ailleurs appeler certaines réserves. Le nombre d'ions Ca^{++} effectivement fixés au cours de l'expérience n'ayant pas dépassé 4 et 3 respectivement. En tout cas le rôle prépondérant des fonctions imidazol doit être exclu.

III. CONCLUSIONS.

L'étude de la variation des constantes d'affinité entre ions et protéine montre un comportement complexe. L'interprétation des résultats doit tenir compte de plusieurs mécanismes possibles, et en particulier de l'action électrostatique et de l'effet de l'état de dissociation des fonctions ionisables présentes dans les emplacements. Nous avons développé les équations qui décrivent ce dernier effet pour deux cas distincts. Dans le premier cas déjà développé par Dixon, l'association ou la dissociation d'un ion H^+ est indispensable pour que la fixation puisse avoir lieu, dans le second cas, l'association ou la dissociation d'un ion hydrogène favorise la fixation sans être indispensable. Ce deuxième cas pourrait avoir une importance particulière au cours des fixations par deux points. La méthode proposée permet de définir le pK des fonctions qui interviennent dans la fixation.

Dans les quatre exemples étudiés ici, cette théorie suffit à rendre compte des phénomènes. Dans ces quatre cas la somme des constantes d'interaction dépend de la dissociation d'au moins une fonction ionisable dans le domaine de pH exploré et dans aucun de ces cas, cette somme ne tend vers zéro dans ce domaine. Ceci signifie que ces fixations ne peuvent pas être interprétées par des emplacements homogènes avec effet déterminant de la dissociation d'un seul ion H^+ . Il faut admettre ou bien que les emplacements sont inhomogènes et certains d'entre

eux sont déterminés par l'état de dissociation d'une fonction, d'autres non, ou bien que les emplacements ont une affinité simplement variable selon l'état de dissociation d'une fonction, mais n'en dépendent pas de façon absolue. Cette seconde hypothèse suggère une fixation par deux points, assez plausible dans le cas des ions bivalents étudiés aussi bien que dans le cas du méthylorange. Enfin il est possible que les emplacements soient à la fois inhomogènes et que certains d'entre eux au moins comportent deux points de fixation.

L'inhomogénéité des emplacements est certaine dans le cas de la fixation du cadmium sur la sérumalbumine où les fonctions imidazol et les fonctions amine sont capables de servir d'emplacements, ainsi que dans le cas de la fixation du cadmium sur la lactoglobuline, où la courbe de formation du complexe à pH 9,3 montre nettement deux emplacements privilégiés.

Dans le cas de la sérumalbumine les trois fixations étudiées varient fortement selon l'état de dissociation des fonctions imidazol. Est-ce dû à l'intervention directe de l'imidazol dans les emplacements de ces trois espèces ioniques, ou bien leur dissociation détermine-t-elle des changements assez importants dans la configuration de la molécule pour influencer sur la fixation de n'importe quel ion ? Nos expériences sont insuffisantes pour répondre à cette question.

■ ■ ■

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

=====

Les fixations multiples d'ions ou de petites molécules sur les protéines suscitent de nombreuses études, en raison des renseignements qu'elles peuvent apporter sur la structure fine des protéines et sur le mécanisme de formation des complexes spécifiques des protéines.

Dans un chapitre préliminaire, nous passons en revue les théories proposées pour appliquer la loi d'action de masse au cas de la fixation multiple. Ces équations, très simples dans l'éventualité d'un groupe homogène d'emplacements, ayant tous la même affinité, se compliquent quand les ions fixés ont une interaction mutuelle et quand les emplacements ne sont pas tous similaires. Dans le cas le plus général, seule la fixation du premier ion peut être décrite sans introduction de paramètres arbitraires, et dans ce cas on peut déterminer la somme des constantes d'interaction de l'ensemble des emplacements, sans connaître leur nombre. L'examen des études montre la rareté des cas, où la fixation se fait indiscutablement sur des emplacements homogènes.

L'étude des variations des constantes d'affinité avec le pH offre un critère plus sévère de l'homogénéité des emplacements que les isothermes à pH constant. Nous montrons que les

variations de pH peuvent influencer par trois mécanismes sur les fixations multiples: par changement de la charge nette de la protéine, par action de masse compétitive ou coopérative des ions hydrogène sur le point de fixation, enfin par modification de la configuration des emplacements. Nous n'avons trouvé dans la littérature aucun exemple, où l'ensemble de ces trois mécanismes ait été pris en considération.

Notre travail a été exécuté à l'aide de deux techniques, la potentiométrie avec une électrode à hydrogène, et la polarographie.

Les titrages potentiométriques des protéines en présence de divers sels donnent des renseignements qualitatifs sur la fixation des ions: un abaissement du pH indique une fixation du cation, une élévation la fixation de l'anion. Deux méthodes permettent d'utiliser ces renseignements pour une évaluation quantitative. La méthode de SCATCHARD, qui repose sur la modification des constantes de dissociation de la protéine sous l'effet de l'action électrostatique des ions fixés. La seconde, proposée dans ce travail, est une extrapolation vers une concentration nulle en protéine. Elle est basée sur la seule hypothèse, que la modification du pH est déterminée de façon univoque par le nombre d'ions d'une seule espèce fixés par molécule de protéine. L'application des deux méthodes dans le cas de la fixation du calcium sur la sérumalbumine donne des résultats différents, mais la variation des affinités en fonction du pH, calculée par les deux méthodes, est parallèle. Une analyse approfondie de la théorie montre que les discordances sont dues essentiellement à la fixation simultanée de l'anion et du cation

avec interaction électrostatique mutuelle entre les deux ions.

La méthode polarographique donne des résultats plus directs. La fixation du cadmium sur la sérumalbumine en fonction du pH, étudiée par cette méthode, se fait en deux étapes. Jusqu'à pH 7,0, 17 emplacements sont disponibles; à pH plus alcalin de nombreux autres emplacements se manifestent. Ils ne sont pas saturés après fixation de 34 ions. Les deux zones sont séparées par un palier, où une augmentation du pH n'entraîne pas une augmentation de la fixation.

Le bleu de méthylène se fixe sur un grand nombre d'emplacements de la sérumalbumine, avec une affinité relativement faible. La fixation augmente de façon régulière avec le pH.

La compétition pour la sérumalbumine entre les ions calcium, cadmium et bleu de méthylène pris deux par deux, est variable selon le domaine de pH. Ceci indique que les emplacements qui sont communs à deux de ces ions n'ont pas tous la même affinité relative pour eux.

La fixation du cadmium sur la lactoglobuline semble homogène à pH 8,2, mais nettement inhomogène à pH 9,3. A ce pH deux emplacements de grande affinité se distinguent des autres emplacements.

Pour étudier les variations des constantes d'affinité en fonction du pH, nous avons développé une méthode de calcul en trois étapes. La première est l'extrapolation des résultats expérimentaux vers la concentration nulle en ion à complexer et la détermination de la somme des constantes d'asso-

ciation de tous les emplacements. La deuxième consiste à représenter les logarithmes des constantes ainsi obtenues en fonction de la charge nette de la protéine et déterminer le facteur d'interaction électrostatique. Enfin, dans la troisième étape, on recalcule les constantes par déduction de l'énergie électrostatique et on les représente en fonction du pH. Cette dernière représentation doit donner des segments horizontaux, séparés par des courbes en S ascendantes ou descendantes, dont les points d'inflexion définissent le pK des fonctions ionisables qui interviennent dans le déterminisme de la fixation.

Cette méthode est appliquée à l'interprétation de quatre systèmes, dont un: sérumalbumine-méthylorange est pris dans la littérature, les trois autres: sérumalbumine-cadmium, sérumalbumine-calcium et lactoglobuline-cadmium résultent de nos propres expériences. Les quatre systèmes donnent des courbes conformes à la théorie.

Dans le cas de la sérumalbumine la dissociation de fonctions ayant un pK de 7,7 (imidazol) favorise la fixation de l'anion méthylorange et défavorise la fixation des cations cadmium et calcium. Ces variations dans les trois cas sont elles dûes à une seule et même modification de l'architecture de la molécule, ou résultent-elles de modifications particulières des emplacements spécifiques à chacun de ces ions aboutissant à des résultats parallèles, nos expériences ne permettent pas de le décider. Notons encore que la fixation du méthylorange sur la sérumalbumine est favorisée en outre par la dissociation de fonctions amine audessus de pH 9.

Dans le cas de la lactoglobuline, la dissociation des fonctions imidazol est sans effet sur la fixation du cadmium, par contre la dissociation de fonctions amine à pH 9,3 fait apparaître deux emplacements de forte affinité.

L'ensemble de cette étude souligne la complexité du phénomène de fixation multiple et montre que l'abandon de certaines hypothèses simplificatrices permet de progresser plus avant dans la connaissance de la structure des emplacements auxquels les protéines doivent leurs aptitudes réactionnelles.

—○—○—○—○—○—○—○—

B I B L I O G R A P H I E

- 1) ABRAMSON (H.A.) Electrokinetic phenomena. Chemical Catalog
Cie, New-York 1934.
- 2) ALBERTY (R.A.) J.Phys; Coll.Chem. 1949. 53, 115.
- 3) ALBERTY (R.A.) J.Am.Chem.Soc. 1951. 73, 3220.
J. Phys. Coll. Chem, 1950. 54, 48.
- 4) ALLEN (T.H.) ORAHOVATS (P.D.) Am.Journal Physiol. 1950. 161, 473.
- 5) ASTRUP (T.), BIRCH-ANDERSEN (A.), SCHILLING (K) Acta Chem.
Scandin. 1954. 8, 901, 1361.
- 6) AUDUBERT (R.) Propriétés électrochimiques des protéines. Actua-
lités scientifiques et industrielles. Herman et Co.
ed. 1935.
- 7) BALLOU (G.) BOYER (P.D.), LUCK (J.M.) J.Biol.Chem. 1945.
159, 111.
- 8) BIER (M.), NORD (F.F.) Arch. Biochem.Biophys., 1951. 33, 320.
- 9) BJERRUM (J.) Metal ammine formation in aqueous solution
P.Haase and Son, Copenhagen 1941.
- 10) BJERRUM (N.) Zeit. Phys. Chem. 1923. 106, 219.- 242.
- 11) " Arch. Biochem. 1950. 26, 442.
- 12) BJORNHOLM (S.), BARBU (E.), MACHEBOEUF (M.) Bull. Soc. Chim.
Biol. 1952. 34, 1083.
- 13) BOYER (P.D.) BALLOU (G.) LUCK (J.M.) J.Biol.Chem. 1946. 162,
199; 1947. 167, 407.
- 14) BOYER (P.D.), LUM (F.G.), BALLOU (G.) LUCK (J.M.), RICE (R.G.)
J. Biol. Chem. 1946. 162, 181.
- 15) BRADLEY (W.) EASTY (G.C.) J. Chem. Soc. 1951, p. 499.
- 16) CANNAN (K.) Chem.Rev. 1942. 30, 395.
- 17) CANNAN (R.K.), KIBRICK (A) J. Am. Chem. Soc. 1938. 60, 2314.
- 18) CARR (Ch.W.), TOPOL (L.) J.Phys.Coll.Chem. 1950. 54, 176.
- 19) CARR (Ch.W.) Arch.Biochem. 1952. 40, 286.
- 20) CARR (C.W.) Arch.Biochem. Biophys. 1953. 43, 147.
- 21) CARR (C.W.) Arch.Biochem. Biophys. 1953. 46 . 417.
- 22) CARR.(C.W.) Arch.Biochem. Biophys. 46.
- 23) CARSTEN (M.E.), EISEN (H.N.) J;Am.Chem. Soc. 1953. 75, 4451.
- 24) CECIL (R.), OGSTON (A.G.) Biochem. J. 1949. 44, 33.
- 25) CHANUTIN (A.), LUDEWIG (S.), MASKET (A.V.) J.Biol. Chem. 1942.
143, 737.
- 26) COGIN (G.E.), DAVIS (B.D.) J.Am.Chem.Soc. 1951. 73, 3135.
- 27) COHN (B.J.), STRONG (L.E.) et coll. J.Am.Chem.Soc. 1946. 68, 459.
- 28) COHN (M.), MONOD (J.) Biochim.Biophys.Acta, 1951. 7, 153.
- 29) COLVIN (J.R.) Canad. J. Chem. 1952. 30, 320.
- 30) COLVIN (J.R.) Canad.J. Chem. 1952. 30, 973.
- 31) COLVIN (J.R.) Canad. J.Biochem.Physiol. 1954. 32, 109.
- 32) COLVIN (J.R.) Canad. J.Biochem.Physiol. 1954. 32, 184.
- 33) COLVIN (J.R.) Canad.J. Biochem.Physiol. 1955. 33, 651.
- 34) CORYELL (C.D.) J. Phys. Chem. 1939. 43, 841.

- 35) DEBYE, HUCKEL. Phys. Z. 1923. 24, 185.
- 36) DIXON (M.) Biochem. J. 1953. 55, 161.
- 37) DIXON et MASSEY Biochem J. 1953. 55 174
- 38) DUGGAN (E.L.), GIESE (A.C.), LUCK (J.M.) Arch. Biochem.
1950. 28, 174.
- 39) DUKE (J.A.), BIER (M.), NORD (F.F.) Arch. Biochem. 1952. 40, 424.
- 40) EDSALL (J.T.), EDELHOCH, LONTIE (R.), MORRISON (L.R.) J. Am.
Chem. Soc. 1950. 72, 4641, 4656.
- 41) EIKNES (K), SCHELLMAN, (J.A./) LUMRY, (R.), SAMUELS (L.T.)
J. Biol. Chem, 1954. 206, 411.
- 42) FIESS (H.A.), KLOTZ (I.M.) J. Am. Chem. Soc. 1952, 74, 887.
- 43) FIELDS (J.E.), LAWRENCE (D.J.R.), REES (V.H.) Biochem. J. 1954. 56.
- 44) FRAENKEL - CONRAT (H) Arch. Biochem, 1950, 28, 452. 1950. 29, 101.
- 45) FREDERICQ (E.), NEURATH (H.) J. Am. Chem. Soc. 1950. 72, 2684.
- 46) GORINI (L.), FROMAGEOT (Cl.) Biochim. Biophys. Acta. 1950. 5, 524.
- 47) GORINI (L) Biochim. Biophys. Acta, 1950. 6, 237.
- 48) GORINI (L.), FELIX (F), FROMAGEOT (Cl) Biochim. Biophys. Acta,
1953. 12, 283.
- 49) GORINI (L.), LABOUESSE-NERCOUROFF (J.) Bioch. Biophys. Acta.
1954. 13, 291.
- 50) GORINI (L.), AUDRAIN (L.) Bioch. Biophys. Acta. 1953. 10, 570.
- 51) GORINI (L.), FELIX (F.) Bioch. Biophys. Acta. 1953. 11, 535.
- 52) GREENBERG (D.M.) Adv. in Prot. Chem. 1944. 1, 121-151.
- 53) GURD (F.R.N.) GOODMAN (S. de Witt.) J. Am. Chem. Soc. 1952, 74, 670.
- 54) HAMER (D.) Biochem. J. 1954. 56, 610.
- 55) HAUROVITZ (F.), Di MOIA (F.), TEKMAN (S.) J. Am. Chem. Soc. 1952.
74, 2265.
- 56) HENRY (V.) Lois générales de l'action des diastases. Paris 1903.
- 57) HOLT (P.F.), BOWKOTT (J.L.E.) Biochem. J. 1954. 57, 471.
- 58) KARUSH (F.), SONENBERG (M.) J. Am. Chem. Soc. 1949. 71, 1369.
- 59) KARUSH (F.) J. Am. Chem. Soc. 1950. 72, 2705.
- 60) KARUSH (F.) J. Am. Chem. Soc. 1950. 72, 2714.
- 61) KARUSH (F.) J. Am. Chem. Soc. 1951. 73, 1246.
- 62) KARUSH (F.) J. Phys. Chem. 1952. 56, 70.
- 63) KARUSH (F.) J. Am. Chem. Soc. 1954. 76, 5536.
- 64) KATZ (S.), KLOTZ (I.M.) Arch. Biochem. Biophys. 1953. 44, 351.
- 65) KEARNEY (E.B.), SINGER (T.P.) Arch. Biochem. Biophys. 1951. 33, 397.
- 66) KEPES (A.) C.R. Acad. Sc. 1954. 239, 117.
- 67) KEPES (A.) C.R. Acad. Sc. 1954. 239, 198.
- 68) KING (E.L.) J. Am. Chem. Soc. 1949. 71, 319.
- 69) KLAMMERTH (O.) Bioch. Zeit. 1955. 327, 62.
- 70) KLOTZ (I.M.) J. Am. Chem. Soc. 1946. 68, 2299.
- 71) KLOTZ (I.M.), WALKER (F.M.), PIVAN (R.B.) J. Am. Chem. Soc.
1946. 68, 1486.
- 72) KLOTZ (I.M.) Arch. Biochem. 1946. 2, 109.
- 73) KLOTZ (I.M.), WALKER (F.M.) Arch. Biochem. 1948. 18, 319.

- 74) KLOTZ (I.M.), TRIWUSH (H.), WALKER (F.M.) J. Am. Chem. Soc. 1948. 70, 2935.
- 75) KLOTZ (I.M.), SCHLESINGER (K.H.) TIETZE (F.) BioI. Bull. 1948. 94, 40.
- 76) KLOTZ (I.M.) URQUHART (J.M.) J. Am. Chem. Soc. 1949. 71, 1597.
- 77) KLOTZ (I.M.), CURME (A.G.) J. Am. Chem. Soc. 1948. 70, 939.
- 78) KLOTZ (I.M.), URQUHART (J.M.) J. Phys. Coll. Chem. 1948. 53, 100.
- 79) KLOTZ (I.M.), URQUHART (J.M.) J. Am. Chem. Soc. 1949. 71, 847.
- 80) KLOTZ (I.M.) Cold Spring Harbour Symposia, 1949, 14, 97.
- 81) KLOTZ (I.M.) URQUHART (J.M.), WEBER (W.W.) Arch. Biochem. Biophys. 1950. 26, 420.
- 82) KLOTZ (I.M.), FALLER (I.L.), URQUHART (J.M.) J. Phys. Coll. Chem. 1950. 54, 18.
- 83) KLOTZ (I.M.), URQUHART (J.M.) J. Am. Chem. Soc. 1951. 73, 3182.
- 84) KLOTZ (I.M.), FIESS (H.A.) J. Phys. Coll. Chem. 1951. 55, 101.
- 85) KLOTZ (I.M.), AYERS (J.) J. Am. Chem. Soc. 1952. 74, 6178.
- 86) KLOTZ (I.M.), BURKHARD (R.K.) URQUHART (J.M.) J. Phys. Chem. 1952. 56, 77.
- 87) KLOTZ (I.M.), GELEWITZ (E.W.), URQUHART (J.M.) J. Am. Chem. Soc. 1952. 74, 209.
- 88) KLOTZ (I.M.) BURKHARD (R.K.), URQUHART (J.M.) J. Am. Chem. Soc. 1952. 74, 202.
- 89) KLOTZ (I.M.) Protein interactions in Neurath (A.) et BAILEY (K.) Protéins vol. I. part. B. p. 727.
- 90) KLOTZ (I.M.), LOH-MING (W.C.) J. Am. Chem. Soc. 1954. 76, 805.
- 91) KLOTZ (I.M.) A symposium on the Mechanisms of enzyme action 1954. p. 257. (John Hopkins Press, Baltimore.
- 92) KLOTZ (I.M.), URQUHART (J.M.), KLOTZ (T.A.) AYERS (J.) J. Am. Chem. Soc. 1955. 77, 1919.
- 93) KOLTHOFF (I.M.), LINGANE (J.J.) Polarography. Interscience Publ. N.Y. 2e ed., 1952.
- 94) IASKOWSKI (M. Jr), SCHERAGA (H.A.) J. Am. Chem. Soc. 1954. 76, 6305.
- 95) LAWRENCE (D.J.R.) Biochem J. 1952. 51, 168.
- 96) LI (N.C.), WHITE (J.M.), DOODY (E.) J. Am. Chem. Soc. 1954. 76, 6219.
- 97) LINGANE (J.J.), LOVERIDGE (B.A.) J. Am. Chem. Soc. 1950, 72, 438.
- 98) LONGSWORTH (L.G.), JACOBSEN (C.F.) J. Phys. Coll. Chem. 1949. 53, 126.
- 99) LUDEWIG (S.), CHANUTIN (A.), MASKET (A.V.) J. Biol. Chem. 1942. 143, 753.
- 100) M'LEAN (F.C.), HASTINGS (A.B.) J. Biol. Chem. 1935, 108, 285.
- 101) MARTIN (N.H.), PERKINS (D.J.) Biochem. J. 1950. 47, 323.
- 102) MARKUS Gabor, BAUMBERGER (J.P.) J. Biol. Chem. 1954. 206, 59.
- 103) MICHAELIS (L.), MENTEN (M.L.) Biochem. Zeit. 1913, 49, 333.
- 104) MONNIER (A.) J. Physiol., 1953. 45, 194.
- 105) MONNIER (A.) J. de Physiol., 1954. 46, 472.
- 106) MURALT (A.L.V.) J. Am. Chem. Soc. 1930. 52, 3518.

- 107) NORTHROP (H.M.), KUNITZ (M.) J.Gen.Physiol. 1924-25. 7, 25.
- 108) NORTHROP (J.M.), KUNITZ (M.) J.Gen.Physiol. 1925-26. 9, 351.
- 109) PEDERSEN (K.O.) Biochem. J. 1936. 30, 961.
- 110) PFANKUCH (E.), HAGENGUTH (K.) Biochem.Z. 1942. 313, 1.
- 111) POLONOWSKY (J.) Thèse, Paris, Masson Ed. 1950.
- 112) PORTER (R.R.) Biochem. J. 1950. 46, 304.
- 113) PUTNAM (F.W.), NEURATH (H.) J.Biol.Chem. 1945. 159, 195.
- 114) SANDOR (G.) Bull.Soc.Chim.Biol. 1937. 19, 555.
- 115) SCATCHARD (G.), BLACK (L.S.) J.Phys.Coll.Chem. 1949. 53, 88.
- 116) SCATCHARD (G.), SCHEINBERG (I.H.), ARMSTRONG (S.A.Jr.)
J.Am.Chem.Soc. 1950. 72, 540.
- 117) SCATCHARD (G.), SCHEINBERG (I.H.), ARMSTRONG (S.A.Jr.)
J.Am.Chem.Soc. 1950. 72, 535.
- 118) SCATCHARD (G.) BATCHELDER (A.C.), BROWN (A.G.) J.Am.Chem.
Soc. 1946, 68, 2320.
- 119) SCATCHARD (G.) Molecular interactions in protein solu-
tions Sigma XI Nation. Lecture 1951.
- 120) SCHELLMAN (J.A.), LUMRY (R.), SAMUELS (L.T.) J. AM chem.
Soc. 1954, 76, 2808.
- 121) SIMMS (H.S.) J.Am.Chem.Soc. 1926, 48, 1239. ibid 1251.
- 122) SMITH (E.L.) LUMRY (R.) Cold Spring Harbor Symp; 1940. 8, 255.
- 123) SMITH (R.F.), BRIGGS (D.R.) J.Phys.Coll.Chem. 1950. 54, 33.
- 124) STRICKS (W.), KOLTHOFF (I.M.) J.Am.Chem.Soc. 1949. 71, 1519.
- 125) TANFORD (Ch.) J.Am.Chem.Soc. 1950. 72, 11.
- 126) TANFORD (Ch.) J.Am.Chem.Soc. 1951. 73, 2066.
- 127) TANFORD (Ch.) J.Am.Chem.Soc. 1952. 74, 211.
- 128) TANFORD (Ch.) J.Am.Chem.Soc. 1952. 74, 6036.
- 129) TANFORD (Ch.), ROBERTS (G.L.J.) J.Am.Chem.Soc. 1952, 74, 2509.
- 130) TANFORD (Ch.), WAGNER (M.L.) J.Am.Chem.Soc. 1953. 75, 434.
- 131) TANFORD (Ch.) J. Phys.Chem. 1955. 59, 788.
- 132) TERESI (J.D.), LUCK (J.M.) J.Biol.Chem. 1948. 174, 653.
- 133) TERESI (J.D.) J.Am.Chem.Soc. 1950. 72, 3972.
- 134) TIMASHEFF (S.N.), NORD (F.F.) Arch.Bioch.Biophys. 1951. 31, 309.
- 135) WARNER (R.C.), WEBER (I.) J.Am.Chem.Soc. 1953. 75, 5094.
- 136) VELICK (S.F.) J.Phys.Coll.Chem. 1949. 53, 135.
- 137) VOLKIN (E.) J.Biol.Chem. 1948. 175, 675.
- 138) WURMSER (R.) Advances in Enzymology. 1954. 15, 49-76.

T A B L E des M A T I E R E S

	Pages
INTRODUCTION	I
<u>PREMIERE PARTIE: Revue critique de l'état actuel de nos</u> <u>connaissances sur les complexes multiples.</u>	9
I. Méthodes d'étude	9
II. Bases théoriques	11
A/ Fixation simple	11
B/ Fixations multiples	12
1) Fixation homogène sans interaction	14
2) Fixation homogène avec interaction élec- trostatique	14
3) Fixation homogène avec interactions com- pétitives ou coopératives	16
4) Fixations hétérogènes	16
5) Fixations coopératives	18
6) Exemples tirés de la littérature	18
C/ Dépendance du pH	21
1) Effet de H^+ par action de masse	21
2) Interaction électrostatique	22
3) Modification de structure	23
4) Exemples tirés de la littérature	23
III. Quelques résultats et leur interprétation	24
<u>DEUXIEME PARTIE: Techniques employées</u>	29
I. Mesures de pH	29
II. Polarographie	30
III. Préparation de la sérumaalbumine	36
IV. Préparation de la lactoglobuline	37
<u>TROISIEME PARTIE: Résultats de la méthode potentiométrique</u>	38
I. Sérumaalbumine	38
A/ Courbes de titrage	38
B/ Abaissement du pH par la force ionique	40

C/ Titrages en présence de calcium	44
D/ Tentatives d'interprétation	49
1) Théorie de Scatchard	49
2) Méthode d'extrapolation	51
E/ Titrages en présence d'ions alcalinoterreux	55
F/ Titrages en présence de cadmium	57
G/ Titrages en présence de sulfocyanure	58
II. Lactoglobuline	59
III. Discussion	60
A/ Hypothèses simplificatrices	60
B/ Leur effet sur le calcul ; , ,	61
1) selon Scatchard	61
2) sur la méthode d'extrapolation	62
C/ Théorie de la fixation simultanée de l'anion et du cation	64
<u>QUATRIEME PARTIE: Résultats de la polarographie</u>	70
I. Sérumbalbumine	
A/ Fixation du cadmium	70
1) Comparaison des méthodes	71
2) Fixation en fonction du pH	72
B/ Fixation du bleu de méthylène	77
C/ Compétitions	80
1) Cadmium-calcium	80
2) Calcium-Bleu de méthylène	82
3) Cadmium-Bleu de méthylène	82
II. Lactoglobuline.	
Fixation du cadmium	84
III. Conclusions	86

<u>CINQUIEME PARTIE: Essai d'interprétation de la fixation</u>	
<u>des ions sur les protéines en fonction du pH.</u>	89
I. Action simultanée de plusieurs mécanismes	89
A/ Mécanisme électrostatique	89
B/ Action de masse de l'ion H^+	90
C/ Modification de structure	92
II. Applications	94
A/ Méthylorange-Sérumalbumine	94
B/ Cadmium-Sérumalbumine	97
C/ Calcium-Sérumalbumine	100
D/ Cadmium-Lactoglobuline	103
III. Conclusions	105
<u>CONCLUSIONS GENERALES</u>	107
BIBLIOGRAPHIE	112

■ ■ ■ ■ ■ ■ ■

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

“ Transport actif d'ions au cours du fonctionnement du système nerveux ”

Vu et approuvé :

Paris, le 3 Décembre 1955

Le Doyen de la Faculté des Sciences

J. PERES

VU

et Permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie
de Paris

Jean SARRAILH

